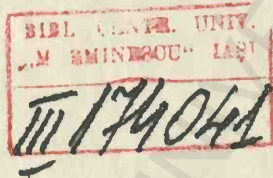


**NATALIA MITRICĂ-KONDI**

# **LABORATORUL CLINIC**

**B I O C H I M I E**

**EDITURA MEDICALĂ**





BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

75  
NATALIA MITRICĂ-KONDI

Chimist dr. doc.  
sef de laborator  
Institutul Cantacuzino,  
București

TABLA DE MATERII

# LABORATORUL CLINIC BIOCHIMIE

EDITURA MEDICALĂ — BUCUREȘTI — 1981



MITRICA-KONDI  
Chimist dr. doc.  
est de laborator  
Institutul Central  
Bucuresti

Cóperta de: GICĂ PETRE

LABORATORUL  
CLINIC  
BIOCHIMIE





## TABLA DE MATERII

|                                                                                             | <u>Pag.</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Capitolul I — GENERALITĂȚI .....</b>                                                     | <b>7</b>    |
| <b>Capitolul II — SOLUȚII, TAMPOANE, INDICATORI.....</b>                                    | <b>28</b>   |
| — Soluții .....                                                                             | 28          |
| — Soluții tampon.....                                                                       | 37          |
| — Indicatori.....                                                                           | 56          |
| <b>Capitolul III — METODE FIZICOCIMICE.....</b>                                             | <b>63</b>   |
| — Metode optice .....                                                                       | 63          |
| — Metode electrice .....                                                                    | 68          |
| — Electroforeza .....                                                                       | 71          |
| — Metode cromatografice .....                                                               | 90          |
| <b>Capitolul IV — METODE IMUNOCIMICE.....</b>                                               | <b>112</b>  |
| — Antigenul .....                                                                           | 112         |
| — Anticorpul .....                                                                          | 113         |
| — Structura imunoglobulinelor.....                                                          | 115         |
| — Biosinteza imunoglobulinelor.....                                                         | 121         |
| — Reacția antigen-anticorp .....                                                            | 126         |
| — Conduita de laborator privind aplicarea testelor imunochimice în laboratorul clinic ..... | 135         |
| — Metode imunochimice aplicate în laboratorul clinic .....                                  | 137         |
| <b>Capitolul V — EXPLORAREA TUBULUI DIGESTIV.....</b>                                       | <b>152</b>  |
| — Stomacul .....                                                                            | 152         |
| — Duodenul .....                                                                            | 165         |
| — Intestinul subțire.....                                                                   | 168         |
| — Intestinul gros (colon).....                                                              | 169         |
| <b>Capitolul VI — SÎNGELE — SUBSTANȚE ORGANICE.....</b>                                     | <b>176</b>  |
| — Dozarea proteinelor.....                                                                  | 176         |
| — Dozarea fibrinogenului .....                                                              | 181         |
| — Teste de disproteinemie .....                                                             | 182         |
| — Dozarea azotului aminic.....                                                              | 186         |
| — Dozarea ureei .....                                                                       | 189         |
| — Dozarea acidului uric.....                                                                | 194         |
| — Dozarea creatininei .....                                                                 | 200         |
| — Dozarea creatinei și creatininei.....                                                     | 201         |
| — Dozarea glucozei.....                                                                     | 202         |

|                                                                       | Pag.       |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| — Dozarea bilirubinei.....                                            | 206        |
| ✓ — Dozarea colesterolului.....                                       | 210        |
| — Dozarea lipidelor totale.....                                       | 214        |
| — Dozarea lecitinei.....                                              | 221        |
| <b>Capitolul VII — URINA — SUBSTANȚE ORGANICE.....</b>                | <b>222</b> |
| — Explorarea biochimică a urinei.....                                 | 222        |
| — Identificarea și determinarea substanțelor organice.....            | 225        |
| — Dozarea compuşilor azotați.....                                     | 229        |
| — Cercetarea amoniacului.....                                         | 230        |
| — Dozarea acizilor aminați.....                                       | 232        |
| — Dozarea creatininei.....                                            | 233        |
| — Dozarea creatininei totale.....                                     | 233        |
| — Indicanul.....                                                      | 233        |
| — Determinarea glucidelor.....                                        | 234        |
| — Compuși cetonici.....                                               | 241        |
| — Pigmenții biliari.....                                              | 243        |
| — Sărurile biliare.....                                               | 247        |
| — Pigmenții singelui.....                                             | 248        |
| — Porfirine în urină.....                                             | 249        |
| — Teste rapide pentru investigația biochimică de uz curent.....       | 250        |
| — Examenul microscopic al urinei.....                                 | 251        |
| — Număratoarea elementelor patologice din urină.....                  | 257        |
| <b>Capitolul VIII — SUBSTANȚE ANORGANICE ÎN URINĂ ȘI ÎN SÎNGE....</b> | <b>260</b> |
| — Determinarea substanțelor anorganice în urină.....                  | 260        |
| — Reziduul total.....                                                 | 260        |
| — Dozarea clorurilor.....                                             | 260        |
| — Dozarea sodiului și potasiului.....                                 | 261        |
| — Dozarea fosforului anorganic.....                                   | 262        |
| — Dozarea calciului.....                                              | 262        |
| — Dozarea sulfului.....                                               | 265        |
| — Determinarea substanțelor anorganice în sânge.....                  | 265        |
| — Dozarea clorului în sânge.....                                      | 265        |
| — Dozarea clorurii de sodiu în ser.....                               | 267        |
| — Dozarea sodiului în ser.....                                        | 268        |
| — Dozarea potasiului în ser.....                                      | 269        |
| — Dozarea calciului în ser.....                                       | 270        |
| — Ionograma.....                                                      | 272        |
| ✓ — Determinarea fierului seric.....                                  | 274        |
| — Dozarea fosforului în ser.....                                      | 276        |
| — Dozarea iodului proteic sanguin.....                                | 277        |
| <b>Capitolul IX — ENZIME ȘI HORMONI ÎN LICHIDELE BIOLOGICE....</b>    | <b>278</b> |
| — Hormoni în lichidele biologice.....                                 | 278        |
| — Dozarea 17-cetosteroidilor totali în urină.....                     | 278        |
| — Dozarea estrogenilor totali.....                                    | 280        |
| — Dozarea activității colinesterazei serice.....                      | 283        |
| — Dozarea activității catalazei serice.....                           | 284        |
| — Dozarea activității tripsinei în sucul pancreatic.....              | 285        |
| — Dozarea activității uropepsinei.....                                | 286        |
| — Dozarea activității erepsinei în sucul duodenal.....                | 288        |
| — Dozarea activității amilazei în ser.....                            | 288        |
| — Dozarea activității lipazei pancreatice.....                        | 290        |
| ✓ — Dozarea activității polipeptidazei.....                           | 291        |
| — Dozarea transaminazelor.....                                        | 292        |
| — Determinarea activității fosfatazelor.....                          | 298        |
| — Dozarea activității fosfatazelor acide.....                         | 300        |

|                                                                                                           | Pag.       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| — Dozarea activității aldolazei.....                                                                      | 304        |
| — Citoenzime .....                                                                                        | 305        |
| <b>Capitolul X — INVESTIGAREA FUNCȚIEI RENALE ȘI HEPATICE PRIN METODE SPECIALE. „CLEARANCE-uri“ .....</b> | <b>309</b> |
| — Clearance-ul creatininei endogene.....                                                                  | 311        |
| — Clearance-ul de uree.....                                                                               | 312        |
| — Proba Romeo .....                                                                                       | 314        |
| — Clearance-ul substanțelor exogene pentru determinarea valorii filtratului glomerular .....              | 315        |
| — Clearance-ul simultan de inulină și PAH.....                                                            | 315        |
| — Determinarea inulinei.....                                                                              | 317        |
| — Clearance-urile de manitol și tiosulfat de sodiu.....                                                   | 317        |
| — Clearance-ul de PAH.....                                                                                | 318        |
| — Probe pentru controlul funcției tubulare.....                                                           | 319        |
| — Clearance-ul de ioni.....                                                                               | 320        |
| — Metode de explorare a funcției renale fără clearance.....                                               | 321        |
| <b>Capitolul XI — LICHIDUL CEFALORAHIDIAN .....</b>                                                       | <b>323</b> |
| — Determinarea proteinelor .....                                                                          | 323        |
| — Punerea în evidență a triptofanului.....                                                                | 326        |
| — Determinarea acetonei .....                                                                             | 326        |
| — Dozarea glucozei.....                                                                                   | 327        |
| — Dozarea clorurilor .....                                                                                | 327        |
| — Proba reducerii permanganatului de potasiu.....                                                         | 328        |
| — Permeabilitatea la nitrați.....                                                                         | 329        |
| — Examenul microscopic .....                                                                              | 329        |
| <b>Capitolul XII — VARIA .....</b>                                                                        | <b>332</b> |
| — Lichidele patologice de puncție.....                                                                    | 332        |
| — Teste de sarcină .....                                                                                  | 334        |
| — Laptele .....                                                                                           | 335        |
| <b>ADDENDUM.....</b>                                                                                      | <b>339</b> |
| — Celule limfocitare .....                                                                                | 339        |
| — Metode de imunologie celulară aplicate în laboratorul clinic.....                                       | 340        |
| — Dozarea complexului Pregnadiol (CPG) (Metoda Crepy).....                                                | 345        |
| — Caracterizarea imunoglobulinelor .....                                                                  | 347        |
| — Proteine serice umane patologice .....                                                                  | 348        |
| — Metode pentru dozarea azotului aminic .....                                                             | 353        |
| — Clearance-ul glomerular cu inulină .....                                                                | 358        |
| — Clearance-uri hepatice .....                                                                            | 358        |
| — Testul de inhibare a hemaglutinării pentru diagnosticul imunologic al sarcinii .....                    | 359        |
| <b>BIBLIOGRAFIE .....</b>                                                                                 | <b>362</b> |



|     |       |
|-----|-------|
| 500 | ..... |
| 501 | ..... |
| 502 | ..... |
| 503 | ..... |
| 504 | ..... |
| 505 | ..... |
| 506 | ..... |
| 507 | ..... |
| 508 | ..... |
| 509 | ..... |
| 510 | ..... |
| 511 | ..... |
| 512 | ..... |
| 513 | ..... |
| 514 | ..... |
| 515 | ..... |
| 516 | ..... |
| 517 | ..... |
| 518 | ..... |
| 519 | ..... |
| 520 | ..... |
| 521 | ..... |
| 522 | ..... |
| 523 | ..... |
| 524 | ..... |
| 525 | ..... |
| 526 | ..... |
| 527 | ..... |
| 528 | ..... |
| 529 | ..... |
| 530 | ..... |
| 531 | ..... |
| 532 | ..... |
| 533 | ..... |
| 534 | ..... |
| 535 | ..... |
| 536 | ..... |
| 537 | ..... |
| 538 | ..... |
| 539 | ..... |
| 540 | ..... |
| 541 | ..... |
| 542 | ..... |
| 543 | ..... |
| 544 | ..... |
| 545 | ..... |
| 546 | ..... |
| 547 | ..... |
| 548 | ..... |
| 549 | ..... |
| 550 | ..... |
| 551 | ..... |
| 552 | ..... |
| 553 | ..... |
| 554 | ..... |
| 555 | ..... |
| 556 | ..... |
| 557 | ..... |
| 558 | ..... |
| 559 | ..... |
| 560 | ..... |
| 561 | ..... |
| 562 | ..... |
| 563 | ..... |
| 564 | ..... |
| 565 | ..... |
| 566 | ..... |
| 567 | ..... |
| 568 | ..... |
| 569 | ..... |
| 570 | ..... |
| 571 | ..... |
| 572 | ..... |
| 573 | ..... |
| 574 | ..... |
| 575 | ..... |
| 576 | ..... |
| 577 | ..... |
| 578 | ..... |
| 579 | ..... |
| 580 | ..... |
| 581 | ..... |
| 582 | ..... |
| 583 | ..... |
| 584 | ..... |
| 585 | ..... |
| 586 | ..... |
| 587 | ..... |
| 588 | ..... |
| 589 | ..... |
| 590 | ..... |
| 591 | ..... |
| 592 | ..... |
| 593 | ..... |
| 594 | ..... |
| 595 | ..... |
| 596 | ..... |
| 597 | ..... |
| 598 | ..... |
| 599 | ..... |
| 600 | ..... |

## CAPITOLUL I

## GENERALITĂȚI

Tabelul 1

## Valori normale ale singelui „Exprimare curentă“

|                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| Densitatea singelui total        | — 1056—1064      |
| Densitatea plasmei               | — 1024—1028      |
| Volumul procentual al hematiilor | — 38—46%         |
| Hemoglobina                      | — 13—18 g/100 ml |

## Substanțe organice (mg %)

|                                |                      |
|--------------------------------|----------------------|
| Glucoza                        | — 70—120 mg/100 ml   |
| Corpi cetonici                 | — 0,3—0,9            |
| Acid oxibutiric                | — 0,5—3,0 mg/100 ml  |
| Acid piruvic                   | — 0,5—1,20 mg/100 ml |
| Acid lactic                    | — 10—15 mg/100 ml    |
| Alcool                         | — 0,5 mg/100 ml      |
| Proteine totale                | — 6,8—8,7 g/100 ml   |
| Albumine totale                | — 4,2—5,6 g/100 ml   |
| Globuline totale               | — 1,5—3,00 g/100 ml  |
| α-globuline                    | — 0,30—0,60 g/100 ml |
| β-globuline                    | — 0,55—1,10 g/100 ml |
| γ-globuline                    | — 0,65—1,30 g/100 ml |
| Albumine/globuline             | — 1,6—2,5            |
| Fibrinogen                     | — 200—600 mg/100 ml  |
| α <sub>2</sub> -lipoproteină   | — 290—770 mg%        |
| α <sub>1</sub> -antitripsină   | — 200—400 mg%        |
| β-lipoproteină                 | — 290—950 mg%        |
| Ceruloplasmina                 | — 20—45 mg%          |
| Haptoglobina                   | — 50—220 mg%         |
| α <sub>2</sub> -macroglobulina | — 150—350 mg%        |
| C <sub>3</sub> -complement     | — 80—140 mg%         |
| Transferina                    | — 200—400 mg%        |
| IgG                            | — 800—1800 mg%       |
| IgA                            | — 90—450 mg%         |
| IgM                            | — 60—250 mg%         |
| Azot total                     | — 30—37 mg/100 ml    |

|                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| Azot neproteic total  | — 20—40 mg/100 ml       |
| Azot rezidual         | — 10—16 mg/100 ml       |
| Azot aminic           | — 3—6 mg/100 ml         |
| Azot polipeptidic     | — 4—6 mg/100 ml         |
| Uree                  | — 20—40 mg/100 ml       |
| Acid uric             | — 2—5 mg/100 ml         |
| Creatinină            | — 1,5—2 mg/100 ml       |
| Creatină + creatinină | — 3—5 mg/100 ml         |
| Indican               | — 0,026—0,085 mg/100 ml |
| Bilirubina totală     | — 0,04—1                |
| Bilirubina directă    | — 0—0,25                |
| Bilirubină indirectă  | — 0,75 mg/100 ml        |
| Cholesterol total     | — 220—300 mg/100 ml     |

*Substanțe anorganice (mg%)*

|                              |                                    |
|------------------------------|------------------------------------|
| Cloruri (NaCl) în ser        | — 570—620 mg/100 ml                |
| Cloruri (NaCl) în globule    | — 290—330 mg/100 ml                |
| Cloruri (NaCl) în plasmă     | — 450—510 mg/100 ml                |
| Clor globular/clor plasmatic | — 0,50—0,55                        |
| Fosfor total în ser          | — 7—15 mg/100 ml                   |
| Fosfor total în singe total  | — 30—50 mg/100 ml                  |
| Sodiu în singe total         | — 170—220 mg/100 ml                |
| Sodiu în plasmă sau ser      | — 310—340 mg/100 ml                |
| Sodiu în eritrocite          | — 40—130 mg/100 ml                 |
| Potasiu în ser               | — 18—20 mg/100 ml                  |
| Potasiu în singe total       | — 170 mg/100 ml                    |
| Calciu în singe total        | — 4,5—6 mg/100 ml                  |
| Calciu în ser                | — 9—11 mg/100 ml                   |
| Calciu în eritrocite         | — 0,6—5,9 mg/100 ml                |
| Fier seric                   | — 70—140 $\mu$ g/100 ml la bărbați |
|                              | — 85—100 $\mu$ g/100 ml la femei   |

*Tabelul II*

**Valorile normale ale lipidelor și ale unor produși rezultați din metabolismul lipidic**

|                                                                                    |                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Lipide totale                                                                      | 50—700 mg%                                 |
| Cholesterol total                                                                  | 220—300 mg%                                |
| Cholesterol liber                                                                  | 20—30 mg%                                  |
| Gliceride                                                                          | 50—150 mg%                                 |
| Fosfolipide                                                                        | 150—220 mg% (5—10 mg% fosfor lipo-solubil) |
| din care:                                                                          |                                            |
| lecitină                                                                           | 66% din totalul de fosfolipide             |
| sfinngomielină                                                                     | 22% din totalul de fosfolipide             |
| lizolecitină                                                                       | 9% din totalul de fosfolipide              |
| cefalină                                                                           | 3% din totalul de fosfolipide              |
| Acizi grași totali (din esterii de colesterol din fosfolipide și din trigliceride) | 150—350 mg% (aproximativ 12 mEq/l)         |
| Acizi grași liberi                                                                 | 12—16 mg% (aproximativ 0,5 mEq/l)          |
| glicerol                                                                           | 0,6—1,6 mg%                                |
| Corpi cetonic                                                                      | 0,3—0,9 mg%                                |



Alimentele cele mai bogate în colesterol (element structural esențial al membranelor celulare) sînt de origine animală și în special sînt următoarele:

|                            | grăsime<br>pore | ficat | unt | rinichi | gălbenuș<br>de ou | creier |
|----------------------------|-----------------|-------|-----|---------|-------------------|--------|
| mg colesterol % g alimente | 100             | 250   | 300 | 350     | 1700              | 3000   |

Tabelul III

#### Valorile normale ale urinei

Densitatea: 1,016—1,025  
 Indice de refracție: 1,3367—1,3465  
 pH: 5,0—5,8  
 Clor (exprimat în NaCl): 10—12 g/24 ore  
 Acid fosforic ( $P_2O_5$ ): 2—5 g/24 ore  
 Calciu: 0,07—0,3 g/24 ore  
 Sulf: 0,5 g/24 ore  
 Azot: 10—15 g/24 ore  
 Amoniac: 0,6—0,8 g/24 ore  
 Uree: 25—35 g/24 ore  
 Acid uric: 0,7 g/24 ore  
 Indican: 4—5 mg/24 ore după regim mixt  
 15—20 mg/24 ore după regim carnat  
 Creatinină: 1,5 g/24 ore  
 Corpî cetonici: 50 mg/24 ore

Tabelul IV

#### Valori comparative ale principalelor componente din LCR și plasmă

|                  | Plasmă mg% | LCR mg% |
|------------------|------------|---------|
| Proteine         | 6300—8500  | 16—38   |
| Aminoacizi       | 4,5—9      | 1,5—3   |
| Creatinină       | 0,7—2      | 0,4—2   |
| Acid uric        | 2,9—6,9    | 0,5—2,8 |
| Colesterol       | 100—150    | absent  |
| Uree             | 20—42      | 5—39    |
| Glucoză          | 70—120     | 45—80   |
| Cloruri (ClNa)   | 560—630    | 720—750 |
| Fosfat anorganic | 2—5        | 1—2     |
| pH               | 7,3—7,4    | 7,3—7,4 |
| Sodiu            | 325        | 325     |
| Potasiu          | 20         | 12—17   |
| Magneziu         | 1—3        | 3—3,6   |
| Calciu           | 9—11       | 4—7,6   |
| Acid lactic      | 10—32      | 8—27    |

Tabelul V

## Caracteristicile sucurilor digestive

| Suc digestiv                                                         | Volum                  | pH                     | Enzime                                                                                                                    | Substanțe organice                                                          |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Salivă                                                               | 1000—1500<br>ml/24 ore | 5,6—7,6<br>medie = 6,7 | amilaza salivară,<br>maltază, lizozomi,<br>lipază                                                                         | —                                                                           |
| Suc gastric                                                          | 1000—3000<br>ml/24 ore | 1,1—2,6<br>medie = 1,8 | pepsină, catepsină,<br>lipază, lizozomi                                                                                   | —                                                                           |
| Bilă <span style="font-size: 1.2em;">{</span> veziculară<br>hepatică | 800—1000<br>ml/24 ore  | 7,4—7,1                | —                                                                                                                         | săruri biliare,<br>săpunuri, coles-<br>terol, fosfolipi-<br>de, acizi grași |
| Suc pancreatic                                                       | 700—1500<br>ml/24 ore  | 7,5—8,8<br>medie = 8,3 | tripsină, chimotrip-<br>sină, amilază, mal-<br>tază, carboxipepti-<br>dază, lipază, pepti-<br>dază, polinucleo-<br>tidaze | —                                                                           |
| Suc intestinal                                                       | 2000—3000<br>ml/24 ore | 7—8,5<br>medie = 8,3   | erepsină, enterochi-<br>nază, glucidază,<br>nucleoază, fosfa-<br>tază, mucus                                              | —                                                                           |

Tabelul VI

## Tabelul principalelor elemente

|           | Simbolul | Greutatea<br>atomică | Densitatea<br>g/cm <sup>3</sup><br>23/4° | Punctul de<br>fuziune (°C) |
|-----------|----------|----------------------|------------------------------------------|----------------------------|
| Aluminiu  | Al       | 26,98                | 2,7                                      | 658                        |
| Antimoniu | Sb       | 121,76               | 6,68                                     | 630                        |
| Argint    | Ag       | 107,88               | 10,5                                     | 960                        |
| Arsenic   | As       | 74,91                | 5,72                                     | 615                        |
| Aur       | Au       | 196,96               | 19,25                                    | 1 063                      |
| Azot      | N        | 14,008               | 1,25                                     | 210,5                      |
| Bariu     | Ba       | 137,36               | 3,5                                      | 710                        |
| Bismut    | Bi       | 209,00               | 9,8                                      | 271                        |
| Bor       | B        | 10,82                | 3,33                                     | 2 300                      |
| Brom      | Br       | 79,916               | 3,14                                     | 7,3                        |

|                  | Simbolul | Greutatea atomică | Densitatea $\text{g/cm}^3$ $25/4^\circ$ | Punctul de fuziune ( $^\circ\text{C}$ ) |
|------------------|----------|-------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| Cadmium          | Cd       | 112,41            | 8,64                                    | 321                                     |
| Calcium          | Ca       | 40,08             | 1,55                                    | 850                                     |
| Carbon (grafit)  | C        | 12,01             | 2,25                                    | 3 562                                   |
| Clor             | Cl       | 35,457            | 1,507                                   | -100,5                                  |
| Crom             | Cr       | 52,01             | 6,92                                    | 1 920                                   |
| Cobalt           | Co       | 58,94             | 8,9                                     | 1 492                                   |
| Cupru            | Cu       | 63,54             | 8,92                                    | 1 084                                   |
| Fier             | Fe       | 55,85             | 7,86                                    | 1 535                                   |
| Fluor            | F        | 19,00             | 1,695                                   | -218                                    |
| Galiu            | Ga       | 69,72             | 5,9                                     | 29,5                                    |
| Hidrogen         | H        | 1,0080            | 0,09                                    | -262                                    |
| Iod              | I        | 126,91            | 4,93                                    | 113,6                                   |
| Litiu            | Li       | 6,94              | 0,534                                   | 179                                     |
| Magneziu         | Mg       | 24,32             | 1,74                                    | 657                                     |
| Mangan           | Mn       | 54,94             | 7,2                                     | 1 221                                   |
| Mercur           | Hg       | 200,61            | 13,55                                   | -38,8                                   |
| Molibden         | Mo       | 95,95             | 10,2                                    | 2 622                                   |
| Nichel           | Ni       | 58,71             | 8,9                                     | 1 453                                   |
| Osmiu            | Os       | 190               | 22,48                                   | 2 700                                   |
| Oxygen           | O        | 16                | 1,429                                   | 218,7                                   |
| Paladiu          | Pd       | 106,7             | 11,97                                   | 1 555                                   |
| Fosfor (alb)     | P        | 30,975            | 1,82                                    | 44,1                                    |
| Platină          | Pt       | 195,09            | 21,45                                   | 1 773                                   |
| Plumb            | Pb       | 207,21            | 11,34                                   | 327                                     |
| Potasiu          | K        | 39,1              | 0,86                                    | 63,5                                    |
| Seleniu          | Se       | 78,96             | 4,26                                    | 220                                     |
| Siliciu (crist.) | Si       | 28,09             | 2,4                                     | 1 414                                   |
| Sodiu            | Na       | 22,99             | 0,97                                    | 97,7                                    |
| Sulf             | S        | 32,06             | 2,07                                    | 112,8                                   |
| Staniu           | Sn       | 118,70            | 7,2                                     | 231,8                                   |
| Stronțiu         | Sr       | 87,63             | 2,16                                    | 757                                     |
| Telur            | Te       | 127,6             | 6,24                                    | 452                                     |
| Taliu            | Tl       | 204,39            | 11,84                                   | 303                                     |
| Titan            | Ti       | 47,90             | 4,4                                     | 1 800                                   |
| Uraniu           | U        | 238,07            | 19,0                                    | 1 689                                   |
| Vanadiu          | V        | 50,95             | 6,07                                    | 1 726                                   |
| Zinc             | Zn       | 65,38             | 7,01                                    | 419,4                                   |
| Wolfram          | W        | 183,86            | 19,3                                    | 3 380                                   |



Tabelul VII

## Hidroxidul de sodiu (NaOH)

| Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% |
|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| 1,000     | 0,159         | 1,110     | 10,10         | 1,220     | 20,07         | 1,330     | 30,20         | 1,440     | 41,03         |
| 1,010     | 0,945         | 1,120     | 11,01         | 1,230     | 20,98         | 1,340     | 31,14         | 1,450     | 42,07         |
| 1,020     | 1,94          | 1,130     | 11,92         | 1,240     | 21,90         | 1,350     | 32,10         | 1,460     | 43,12         |
| 1,030     | 2,84          | 1,140     | 12,83         | 1,250     | 22,82         | 1,360     | 33,06         | 1,470     | 44,17         |
| 1,040     | 3,745         | 1,150     | 13,73         | 1,260     | 23,73         | 1,370     | 34,03         | 1,480     | 45,22         |
| 1,050     | 4,655         | 1,160     | 14,64         | 1,270     | 24,645        | 1,380     | 35,01         | 1,490     | 46,27         |
| 1,060     | 5,56          | 1,170     | 15,54         | 1,280     | 25,56         | 1,390     | 36,00         | 1,500     | 47,33         |
| 1,070     | 6,47          | 1,180     | 16,44         | 1,290     | 26,48         | 1,400     | 36,99         | 1,510     | 48,38         |
| 1,080     | 7,38          | 1,190     | 17,345        | 1,300     | 27,41         | 1,410     | 37,99         | 1,520     | 49,44         |
| 1,090     | 8,28          | 1,200     | 18,255        | 1,310     | 28,33         | 1,420     | 38,99         | 1,530     | 50,50         |
| 1,100     | 9,19          | 1,210     | 19,16         | 1,320     | 29,26         | 1,430     | 40,00         |           |               |

Tabelul VIII

Acidul sulfuric ( $H_2SO_4$ )

| Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% | Densitate | Greutate<br>% |
|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| 1,000     | 0,2609        | 1,180     | 25,21         | 1,360     | 46,33         | 1,540     | 63,81         | 1,720     | 79,37         |
| 1,005     | 0,9855        | 1,185     | 25,84         | 1,365     | 46,86         | 1,545     | 64,26         | 1,725     | 79,81         |
| 1,010     | 1,731         | 1,190     | 26,47         | 1,370     | 47,39         | 1,550     | 64,71         | 1,730     | 80,25         |
| 1,015     | 2,485         | 1,195     | 27,10         | 1,375     | 47,92         | 1,555     | 65,15         | 1,735     | 80,70         |
| 1,020     | 3,242         | 1,200     | 27,72         | 1,380     | 48,45         | 1,560     | 65,59         | 1,740     | 81,16         |
| 1,025     | 4,000         | 1,205     | 28,33         | 1,385     | 48,97         | 1,565     | 66,03         | 1,745     | 81,62         |
| 1,030     | 4,746         | 1,210     | 28,95         | 1,390     | 49,48         | 1,570     | 66,47         | 1,750     | 82,09         |
| 1,035     | 5,493         | 1,215     | 29,57         | 1,395     | 49,99         | 1,575     | 66,91         | 1,755     | 82,57         |
| 1,040     | 6,237         | 1,220     | 30,18         | 1,400     | 50,50         | 1,580     | 67,35         | 1,760     | 83,06         |
| 1,045     | 6,956         | 1,225     | 30,79         | 1,405     | 51,01         | 1,585     | 67,79         | 1,765     | 83,57         |
| 1,050     | 7,704         | 1,230     | 31,40         | 1,410     | 51,52         | 1,590     | 68,23         | 1,770     | 84,08         |
| 1,055     | 8,415         | 1,235     | 32,01         | 1,415     | 52,02         | 1,595     | 68,66         | 1,775     | 84,61         |
| 1,060     | 9,129         | 1,240     | 32,61         | 1,420     | 52,51         | 1,600     | 69,09         | 1,780     | 85,16         |
| 1,065     | 9,843         | 1,245     | 33,22         | 1,425     | 53,01         | 1,605     | 69,53         | 1,785     | 85,74         |
| 1,070     | 10,56         | 1,250     | 33,82         | 1,430     | 53,50         | 1,610     | 69,96         | 1,790     | 86,35         |
| 1,075     | 11,26         | 1,255     | 34,42         | 1,435     | 54,00         | 1,615     | 70,39         | 1,795     | 86,99         |
| 1,080     | 11,96         | 1,260     | 35,01         | 1,440     | 54,49         | 1,620     | 70,82         | 1,800     | 87,69         |
| 1,085     | 12,66         | 1,265     | 35,60         | 1,445     | 54,97         | 1,625     | 71,25         | 1,805     | 88,43         |
| 1,090     | 13,36         | 1,270     | 36,19         | 1,450     | 55,45         | 1,630     | 71,67         | 1,810     | 89,23         |
| 1,095     | 14,04         | 1,275     | 36,78         | 1,455     | 55,93         | 1,635     | 72,09         | 1,815     | 90,12         |
| 1,100     | 14,73         | 1,280     | 37,36         | 1,460     | 56,41         | 1,640     | 72,52         | 1,820     | 91,11         |
| 1,105     | 15,41         | 1,285     | 37,95         | 1,465     | 56,89         | 1,645     | 72,95         | 1,821     | 91,33         |
| 1,110     | 16,08         | 1,290     | 38,53         | 1,470     | 57,36         | 1,650     | 73,37         | 1,822     | 91,56         |
| 1,115     | 16,76         | 1,295     | 39,10         | 1,475     | 57,84         | 1,655     | 73,80         | 1,823     | 91,79         |
| 1,120     | 17,43         | 1,300     | 39,68         | 1,480     | 58,31         | 1,660     | 74,22         | 1,824     | 92,00         |
| 1,125     | 18,09         | 1,305     | 40,25         | 1,485     | 58,78         | 1,665     | 74,64         | 1,825     | 92,25         |
| 1,130     | 18,76         | 1,310     | 40,82         | 1,490     | 59,24         | 1,670     | 75,07         | 1,826     | 92,51         |
| 1,135     | 19,42         | 1,315     | 41,39         | 1,495     | 59,70         | 1,675     | 75,49         | 1,827     | 92,77         |
| 1,140     | 20,08         | 1,320     | 41,95         | 1,500     | 60,17         | 1,680     | 75,92         | 1,828     | 93,03         |
| 1,145     | 20,73         | 1,325     | 42,51         | 1,505     | 60,62         | 1,685     | 76,34         | 1,829     | 93,33         |
| 1,150     | 21,38         | 1,330     | 43,07         | 1,510     | 61,08         | 1,690     | 76,77         | 1,830     | 93,64         |
| 1,155     | 22,03         | 1,335     | 43,62         | 1,515     | 61,54         | 1,695     | 77,20         | 1,831     | 93,94         |
| 1,160     | 22,63         | 1,340     | 44,22         | 1,520     | 61,61         | 1,700     | 77,20         | 1,832     | 94,24         |
| 1,165     | 23,31         | 1,345     | 44,72         | 1,525     | 62,45         | 1,705     | 78,06         | 1,833     | 94,72         |
| 1,170     | 23,95         | 1,350     | 45,26         | 1,530     | 62,91         | 1,710     | 78,49         |           |               |
| 1,175     | 24,58         | 1,355     | 45,80         | 1,535     | 63,36         | 1,715     | 78,93         |           |               |



## Acidul clorhidric (HCl)

| Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % |
|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| 1,000     | 0,3600     | 1,045     | 9,510      | 1,085     | 17,45      | 1,125     | 25,22      | 1,165     | 33,16      |
| 1,005     | 1,360      | 1,050     | 10,52      | 1,090     | 18,43      | 1,130     | 26,20      | 1,170     | 34,18      |
| 1,010     | 2,364      | 1,055     | 11,52      | 1,095     | 19,41      | 1,135     | 27,18      | 1,175     | 35,20      |
| 1,015     | 3,374      | 1,060     | 12,51      | 1,100     | 20,39      | 1,140     | 28,18      | 1,180     | 36,23      |
| 1,020     | 4,388      | 1,065     | 13,50      | 1,105     | 21,36      | 1,145     | 29,17      | 1,185     | 37,27      |
| 1,025     | 5,408      | 1,070     | 14,495     | 1,110     | 22,33      | 1,150     | 30,14      | 1,190     | 38,32      |
| 1,030     | 6,433      | 1,075     | 15,485     | 1,115     | 23,29      | 1,155     | 31,14      | 1,195     | 39,37      |
| 1,035     | 7,464      | 1,080     | 16,47      | 1,120     | 24,25      | 1,160     | 32,14      | 1,198     | 40,00      |
| 1,040     | 8,490      |           |            |           |            |           |            |           |            |

Tabelul X

Acidul nitric (HNO<sub>3</sub>)

| Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % | Densitate | Greutate % |
|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| 1,000     | 0,333      | 1,130     | 22,38      | 1,260     | 42,14      | 1,390     | 64,74      | 1,504     | 97,74      |
| 1,005     | 1,255      | 1,135     | 23,16      | 1,265     | 42,92      | 1,395     | 65,84      | 1,505     | 97,99      |
| 1,010     | 2,164      | 1,140     | 23,94      | 1,270     | 43,70      | 1,400     | 66,97      | 1,506     | 98,25      |
| 1,015     | 3,073      | 1,145     | 24,71      | 1,275     | 44,48      | 1,405     | 68,10      | 1,507     | 98,50      |
| 1,020     | 3,982      | 1,150     | 25,48      | 1,280     | 45,27      | 1,410     | 69,23      | 1,508     | 98,76      |
| 1,025     | 4,883      | 1,155     | 26,24      | 1,285     | 46,06      | 1,415     | 70,39      | 1,509     | 99,02      |
| 1,030     | 5,784      | 1,160     | 27,00      | 1,290     | 46,85      | 1,420     | 71,63      | 1,510     | 99,26      |
| 1,035     | 6,661      | 1,165     | 27,76      | 1,295     | 47,63      | 1,425     | 72,86      | 1,511     | 99,52      |
| 1,040     | 7,530      | 1,170     | 28,51      | 1,300     | 48,42      | 1,430     | 74,09      | 1,512     | 99,77      |
| 1,045     | 8,398      | 1,175     | 29,25      | 1,305     | 49,21      | 1,435     | 75,35      | 1,513     | 100,00     |
| 1,050     | 9,259      | 1,180     | 30,00      | 1,310     | 50,00      | 1,440     | 76,71      |           |            |
| 1,055     | 10,12      | 1,185     | 30,74      | 1,315     | 50,85      | 1,445     | 78,07      |           |            |
| 1,060     | 10,97      | 1,190     | 31,47      | 1,320     | 51,71      | 1,450     | 79,43      |           |            |
| 1,065     | 11,81      | 1,195     | 32,21      | 1,325     | 52,56      | 1,455     | 80,88      |           |            |
| 1,070     | 12,65      | 1,200     | 32,94      | 1,330     | 53,41      | 1,460     | 82,39      |           |            |
| 1,075     | 13,48      | 1,205     | 33,68      | 1,335     | 54,27      | 1,465     | 83,91      |           |            |
| 1,080     | 14,31      | 1,210     | 34,41      | 1,340     | 55,13      | 1,470     | 85,50      |           |            |
| 1,085     | 15,13      | 1,215     | 35,16      | 1,345     | 56,04      | 1,475     | 87,29      |           |            |
| 1,090     | 15,95      | 1,220     | 35,93      | 1,350     | 56,95      | 1,480     | 89,07      |           |            |
| 1,095     | 16,76      | 1,225     | 36,70      | 1,355     | 57,87      | 1,485     | 91,13      |           |            |
| 1,100     | 17,58      | 1,230     | 37,48      | 1,360     | 58,78      | 1,490     | 93,49      |           |            |
| 1,105     | 18,39      | 1,235     | 38,25      | 1,365     | 59,69      | 1,495     | 95,46      |           |            |
| 1,110     | 19,19      | 1,240     | 39,02      | 1,370     | 60,67      | 1,500     | 96,73      |           |            |
| 1,115     | 20,00      | 1,245     | 39,80      | 1,375     | 61,69      | 1,501     | 96,98      |           |            |
| 1,120     | 20,79      | 1,250     | 40,58      | 1,380     | 62,70      | 1,502     | 97,23      |           |            |
| 1,125     | 21,59      | 1,255     | 41,36      | 1,385     | 63,72      | 1,503     | 97,49      |           |            |

Substanțe și soluții anticoagulante

| Substanțe:                               | Conținutul:                                                                                                                 |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| — fluorură de sodiu<br>— oxalat de sodiu |                                                                                                                             |
| Soluții:                                 |                                                                                                                             |
| — heparină                               | 5 000 U/fiolă                                                                                                               |
| — citrat de sodiu 3,8%:                  | citrat de sodiu 3,8 g<br>apă 100 ml                                                                                         |
| — Alsever:                               | citrat de sodiu 8 g<br>clorură de sodiu 4,2 g<br>glucoză 20,5 g<br>acid citric 10% 8 ml<br>apă distilată 1 000 ml<br>pH 6,1 |

Tabelul XII

Substanțe și soluții pentru conservarea produselor biologice

| Substanțe:                         | Concentrația: |
|------------------------------------|---------------|
| — timol<br>— toluol<br>— cloroform |               |
| Soluții:                           |               |
| — Azidă Na .....                   | 1%            |
| — mertiolat Na .....               | 1‰            |
| — cloramină .....                  | 1%            |
| — apă oxigenată .....              | 5—6%          |
| — permanganat de potasiu .....     | 5%            |
| — clorat de potasiu .....          | 1%            |
| — alcool etilic .....              | 70%           |
| — formol .....                     | 5%            |
| — fenol (creozoli, creolină) ..... | 5—10%         |
| — sublimat .....                   | 1%            |

Unități de măsură folosite în laboratorul clinic

— Metrul (m) = unitate pentru lungime

$$1 \text{ m} = 1000 \text{ mm} = 10^3 \text{ mm}$$

$$\text{Micron } (\mu) = 0,001 \text{ mm} = 10^{-3} \text{ mm}$$

$$\text{Micron} = 10\,000 \text{ Å}$$

$$\text{Milimicron } (m\mu) = 0,000001 \text{ mm}$$

$$\text{Angström } (\text{Å}) = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-7} \text{ mm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$\text{Å} = 0,0000000001 \text{ m} = 10^{-10} \text{ m}$$

— Metrul pătrat ( $m^2$ ) = unitate pentru suprafețe

$$1 m^2 = 10\,000 cm^2 = 1\,000\,000 mm^2$$

— Litrul (l) = unitate pentru capacități

$$1 \text{ litru} = 1\,000 \text{ ml} = 1\,000 \text{ cm}^3$$

$$1 \text{ litru} = 10^3 \text{ ml} = 10^6 \mu l$$

$$1 \text{ ml} = 10^{-3} l$$

$$1 \text{ microlitru } (\mu l) = 10^{-6} l$$

$$\text{nanolitru } (nl) = 10^{-9} l$$

$$\text{picolitru } (pl) = 10^{-12} l$$

$$\text{femtolitru } (fl) = 10^{-15} l$$

$$\text{otolitru } (ol) = 10^{-18} l$$

— Kilogramul (kg) = unitate pentru greutate

$$1 \text{ kilogram } (kg) = 1\,000 g = 10^3 g$$

$$1 g = 1\,000 mg$$

$$1 mg = 10^{-3} g$$

$$\text{microgramul } (\mu g) = 10^{-6} g = 10^{-3} mg = 0,001 mg;$$

$$1 \gamma = 0,001 mg$$

$$\text{nanogramul } (ng) = 10^{-9} g$$

$$\text{picogramul } (pg) = 10^{-12} g$$

Rezultatele în laboratorul clinic se exprimă destul de frecvent în moli și echivalenți.

1 mol este cantitatea dintr-o substanță exprimată în grame numeric egală cu greutatea moleculară.

Submultipli molului sînt:

$$\text{milimol } (mmol) = 10^{-3} \text{ mol}$$

$$\text{micromol } (\mu mol) = 10^{-6} \text{ mol}$$

$$\text{nanomol } (nmol) = 10^{-9} \text{ mol}$$

$$\text{picomol } (pmol) = 10^{-12} \text{ mol}$$

1 echivalent gram este cantitatea dintr-o substanță exprimată în grame numeric egală cu echivalentul chimic.

Submultipli echivalentului sînt:

$$\text{miliechivalentul } (mEq) = 10^{-3} Eq$$

$$\text{microechivalentul } (\mu Eq) = 10^{-6} Eq$$

$$\text{nanoechivalentul } (nEq) = 10^{-9} Eq$$

Gramele, molii, echivalenții și submultipli corespunzători se raportează la litrul de lichid, iar miligramele la 100 ml lichid.

#### Fracții și multipli

| Fracția   | Prefixul | Simbolul | Multiplul | Prefixul | Simbolul |
|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| $10^{-1}$ | deci     | d        | 10        | deca     | da       |
| $10^{-2}$ | centi    | c        | $10^2$    | hecto    | h        |
| $10^{-3}$ | mili     | m        | $10^3$    | kilo     | k        |
| $10^{-6}$ | micro    | $\mu$    | $10^6$    | mega     | m        |
| $10^{-9}$ | nano     | n        | $10^9$    | giga     | g        |



## Transformarea miligramelor în miliechivalenți

Exprimarea ionilor în lichidele biologice se face în miligrame și miliechivalenți.

În cazul exprimării în miliechivalenți se ține seama de valența proprie a ionilor.

$$1 \text{ miliechivalent} = \frac{\text{greutatea moleculară}}{\text{valență}}$$

$$1 \text{ mEq} = \frac{\text{gm}}{V}$$

Se dau exemple în care unii ioni sînt monovalenți iar alții bivalenți:

$$1 \text{ mEq Na}^+ = \frac{23}{1} \text{ mg} = 23 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq K}^+ = \frac{39}{1} \text{ mg} = 39 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq Cl}^- = \frac{35}{1} \text{ mg} = 35 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq Ca}^{++} = \frac{40}{2} \text{ mg} = 20 \text{ mg}$$

$$1 \text{ mEq Mg}^{++} = \frac{24,4}{2} \text{ mg} = 12,2 \text{ mg}$$

Transformarea miligramelor în miliechivalenți se face aplicînd formula:

$$\text{miliechivalenți} = \text{miligrame} \times \frac{\text{valență}}{\text{greutate moleculară}}$$

$$\text{mEq} = \text{mg} \times \frac{V}{\text{GM}}$$

Transformarea miligramelor în miliechivalenți este redată în exemplele care urmează:

1. Urina conține 10 500 mg de  $\text{Cl}^-$  și 690 mg de  $\text{Na}^+$  care transformați în miliechivalenți dau 300 mEq  $\text{Cl}^-$  și 300 mEq  $\text{Na}^+$ .

$$\frac{10\,500}{35} = 300 \text{ mEq de } \text{Cl}^-$$

$$\frac{690}{23} = 300 \text{ mEq de } \text{Na}^+$$

În urină, întreaga cantitate de Na este combinată cu Cl iar eliminarea acestor elemente este izoionică.



2. Plasma conține 3600 mg de  $\text{Cl}^-$  și 3260 mg de  $\text{Na}^+$

$$\frac{3\,600}{35} = 103 \text{ mEq de } \text{Cl}^-$$

$$\frac{3\,260}{23} = 142 \text{ mEq de } \text{Na}^+$$

$$(142 - 103 = 39)$$

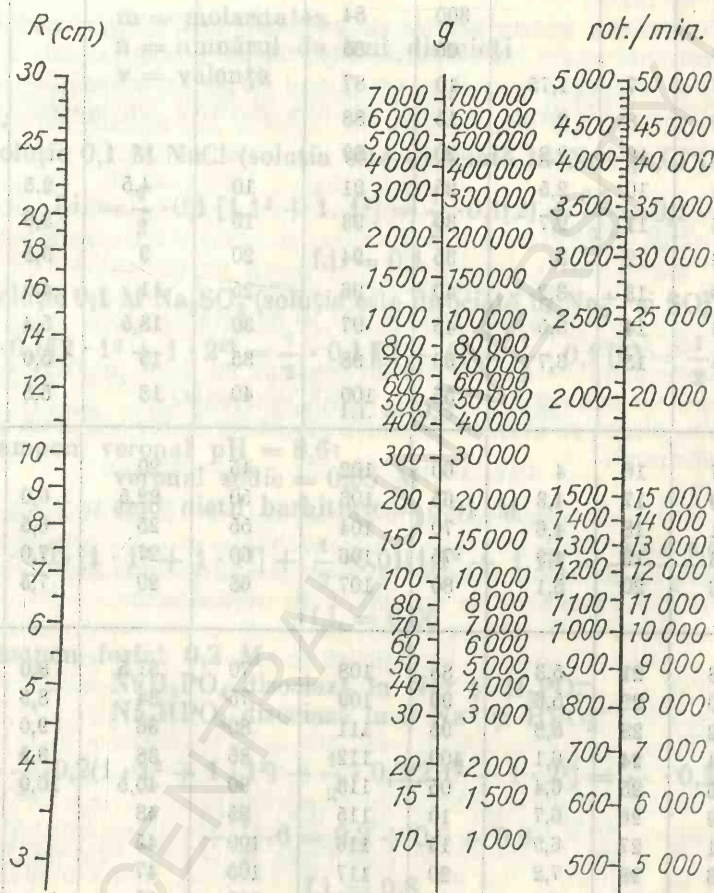


Fig. 1. — Nomograma pentru calcularea forței centrifugale relative. Pentru a calcula forța centrifugală relativă ( $g$ ) cunoscând raza ( $R$ ) și numărul de rotații pe minut ( $\text{rot./min.}$ ) se aliniază valorile corespunzătoare pentru  $R$  și  $\text{rot./min.}$  pe scările respective și se citește punctul de intersecție pe scara din mijloc ( $g$ ).

În plasmă concentrația acestor doi ioni nu este izoionică, așa că 39 mEq de  $\text{Na}^+$  sint combinați cu alți anioni, formînd compuși, dintre care cel mai important este bicarbonatul de sodiu ( $\text{NaHCO}_3$ ).

Tabel de conversiune din mg% în mEq/litru

| Sodiu |       | Potasiu |       | Clor |       | Rezervă alcalină |       | Protide |       |
|-------|-------|---------|-------|------|-------|------------------|-------|---------|-------|
| mg%   | mEq/l | mg%     | mEq/l | mg%  | mEq/l | vol. %           | mEq/l | g%      | mEq/l |
| 250   | 109   |         |       | 290  | 81    |                  |       |         |       |
| 55    | 111   |         |       | 95   | 82    |                  |       |         |       |
| 60    | 113   |         |       | 300  | 84    |                  |       |         |       |
| 65    | 115   |         |       | 05   | 85    |                  |       |         |       |
| 70    | 117   | 7       | 1,75  | 10   | 87    |                  |       |         |       |
| 75    | 120   | 8       | 2     | 15   | 88    |                  |       |         |       |
| 80    | 122   | 9       | 2,2   | 20   | 89    |                  |       |         |       |
| 85    | 124   | 10      | 2,5   | 25   | 91    | 10               | 4,5   | 2,5     | 6,4   |
| 90    | 126   | 11      | 2,7   | 30   | 93    | 15               | 7     | 3,0     | 7,3   |
| 95    | 128   | 12      | 3     | 35   | 94    | 20               | 9     | 3,5     | 8,5   |
| 300   | 130   | 13      | 3,2   | 40   | 96    | 25               | 11    | 4,0     | 9,7   |
| 05    | 133   | 14      | 3,5   | 45   | 97    | 30               | 13,5  | 5,4     | 10,9  |
| 10    | 135   | 15      | 3,7   | 50   | 98    | 35               | 15    | 5,0     | 12,1  |
|       |       |         |       | 55   | 100   | 40               | 18    | 5,5     | 13,3  |
| 15    | 137   | 16      | 4     | 60   | 102   | 45               | 20    |         |       |
| 20    | 139   | 17      | 4,3   | 65   | 103   | 50               | 22,5  | 6,0     | 14,6  |
| 25    | 141   | 18      | 4,6   | 70   | 104   | 55               | 25    | 6,5     | 15,8  |
| 30    | 143   | 19      | 4,9   | 75   | 106   | 60               | 27    | 7,0     | 17    |
| 35    | 146   | 20      | 5,1   | 80   | 107   | 65               | 29    | 7,5     | 18,2  |
| 40    | 148   | 21      | 5,3   | 85   | 108   | 70               | 31,5  | 8,0     | 19,4  |
| 45    | 150   | 22      | 5,6   | 90   | 109   | 75               | 34    | 8,5     | 20,6  |
| 50    | 152   | 23      | 5,8   | 95   | 111   | 80               | 36    | 9,0     | 21,9  |
| 55    | 154   | 24      | 6,1   | 400  | 112   | 85               | 38    | 9,5     | 23,1  |
| 60    | 156   | 25      | 6,4   | 05   | 113   | 90               | 40,5  | 10,0    | 24,3  |
| 65    | 159   | 26      | 6,7   | 10   | 115   | 95               | 43    |         |       |
| 70    | 161   | 27      | 6,9   | 15   | 116   | 100              | 45    |         |       |
| 75    | 163   | 28      | 7,2   | 20   | 117   | 105              | 47    |         |       |
| 80    | 165   | 29      | 7,4   | 25   | 119   | 110              | 50    |         |       |
| 85    | 167   | 30      | 7,7   | 30   | 120   |                  |       |         |       |
| 90    | 169   | 31      | 7,9   | 35   | 122   |                  |       |         |       |
| 95    | 172   | 32      | 8,2   | 40   | 123   |                  |       |         |       |
| 400   | 174   | 33      | 8,4   | 45   | 125   |                  |       |         |       |
| 05    | 176   | 34      | 8,7   | 50   | 126   |                  |       |         |       |
| 10    | 178   | 35      | 8,9   | 55   | 127   |                  |       |         |       |
|       |       | 36      | 9,2   | 60   | 129   |                  |       |         |       |
|       |       | 37      | 9,4   | 65   | 131   |                  |       |         |       |

## Calcularea forței ionice

Forța ionică este o mărime definită ca fiind jumătate din suma obținută prin înmulțirea concentrațiilor molare ( $m$ ) ale fiecărui ion din soluții cu pătratul sarcinii sale electrice ( $V$ ). Alte denumiri ale forței ionice sînt: puterea ionică, tăria ionică (f.i.,  $\mu$ ).

Pentru calcularea forței ionice se aplică formula:

$$f.i. = \mu = \frac{1}{2} m \sum nv^2$$

$m$  = molaritatea

$n$  = numărul de ioni disociați

$v$  = valența

*Exemplu:*

1. Soluție 0,1 M NaCl (soluția este disociată în  $Na^+$  și  $Cl^-$ ).

$$f.i. = \frac{1}{2} \cdot 0,1 [1 \cdot 1^2 + 1 \cdot 1^2] = \frac{1}{2} \cdot 0,1 [2] = \frac{0,2}{2} = 0,1$$

$$f.i. = 0,1$$

2. Soluție 0,1 M  $Na_2SO_4$  (soluția este disociată în  $Na_2^+$  și  $SO_4^{2-}$ )

$$f.i. = \frac{1}{2} \cdot 0,1 [2 \cdot 1^2 + 1 \cdot 2^2] = \frac{1}{2} \cdot 0,1 [2 + 4] = \frac{1}{2} \cdot 0,1 [6] = \frac{1}{2} \cdot 0,6 = 0,3$$

$$f.i. = 0,3$$

3. Tampon veronal pH = 8,6:

veronal sodic = 0,05 M

acid dietil barbituric = 0,01 M

$$f.i. = \frac{1}{2} \cdot 0,05 [1 \cdot 1^2 + 1 \cdot 1^2] + \frac{1}{2} \cdot 0,01 [1 \cdot 1^2 + 1 \cdot 1^2] = \frac{0,1 + 0,02}{2} = 0,06$$

$$f.i. = 0,06$$

4. Tampon fosfat 0,2 M

$NaH_2PO_4$  disociază în  $Na^+$  și  $H_2PO_4^-$

$Na_2HPO_4$  disociază în 2  $Na^+$  și  $HPO_4^{2-}$

$$f.i. = \frac{1}{2} \cdot 0,2 (1 \cdot 1^2 + 1 \cdot 1^2) + \frac{1}{2} \cdot 0,2 (2 \cdot 1^2 + 1 \cdot 2^2) = \frac{1}{2} \cdot 0,2 (2) +$$

$$+ \frac{1}{2} \cdot 0,6 = 0,2 + 0,6 = 0,8$$

$$f.i. = 0,8$$

## IDENTIFICAREA RAPIDĂ A PROTEINELOR, GLUCIDELOR ȘI LIPIDELOR ÎN LABORATORUL CLINIC

### PROTEINELE

**Reacția Biuret:**

*Reactivi:*

NaOH 20—30%

$CuSO_4$  soluție saturată apoasă



*Modul de lucru:*

Se amestecă un volum soluție de cercetat cu un volum NaOH și 3—5 picături soluție sulfat de cupru diluată 1/30.

Apariția culorii violet-viu pune în evidență prezența proteinei în proba de cercetat.

**Reacția xantoproteică:**

*Reactivi:*

NaOH sau KOH 20—30 %

HNO<sub>3</sub> concentrat

*Modul de lucru:*

Se amestecă un volum soluție de cercetat cu 2—3 picături HNO<sub>3</sub>. În prezența proteinei apare fie o opalescență, fie un precipitat alb. La fierbere precipitatul se colorează în galben-viu. După răcire se adaugă 5—10 picături soluție NaOH sau KOH și în cazul reacției pozitive va apărea o culoare oranj-viu.

**GLUCIDELE**

**Reacția cu alfa naftol:**

*Reactivi:*

alfa naftol soluție alcoolică 1 %

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat d = 1,84

*Modul de lucru:*

Se amestecă un volum soluție de cercetat cu 2—3 picături soluție alfa naftol și apoi se adaugă 1—1,5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat:

La limita dintre straturi în prezența glucidelor se formează un inel violet.

**Reacția Selivanov:**

*Reactivi:*

rezorcină 0,01 g în 10 ml H<sub>2</sub>O + 10 ml HCl concentrat.

*Modul de lucru:*

Se amestecă un volum soluție de cercetat + 2 volume Selivanov. În prezența glucidelor amestecul se colorează în roșu-deschis.

**LIPIDELE**

**Reacția cu vanilină:**

*Reactivi:*

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> d = 1,84

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> d = 1,70

vanilină 0,6 g% ml. H<sub>2</sub>O distilată.

*Modul de lucru:* se amestecă 5 picături din proba de cercetat + 2 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 2 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 0,5 ml soluție de vanilină. După o menținere de 15 minute la 37°C amestecul este răcit. Prezența lipidelor este pusă în evidență prin apariția unei colorații violet.

**Reacția cu Sudan negru B:**

*Reactivi:*

soluție saturată Sudan negru B (folosită la electroforeză).

*Modul de lucru:* o picătură probă de cercetat se pune pe o bucată de hîrtie de filtru. După uscarea petei se lasă hîrtia o oră în soluția de Sudan negru B, se usucă și se spală de mai multe ori cu alcool 50% pentru îndepărtarea colorantului în exces. Dacă proba de cercetat conține lipide pe hîrtia de filtru apare o pată de culoare neagră.

## Reacția cu Lugol:

### Reactiv Lugol:

iodură de potasiu 10 g

iod cristalizat 5 g

apă distilată 100 g

**Modul de lucru:** o picătură din proba de cercetat se amestecă cu o picătură reactiv Lugol. După 5 minute se citește rezultatul, după ce s-a amestecat cu o picătură de tiosulfat de Na 10%; în caz că este pozitiv, se observă o floculare.

## FRACTIONAREA PROTEINELOR PRIN SĂRURI NEUTRE ȘI SOLVENȚI ORGANICI (ETANOL ȘI ACETONĂ)

Fracționarea proteinelor în prezența agenților precipitanți se bazează pe scoaterea proteinelor din soluție, proteina trecând din faza lichidă în faza solidă. Acest efect este cunoscut sub denumirea de „relargaje” (în franceză) sau „saltingout” (în engleză).

Scoaterea proteinei din soluție se realizează prin micșorarea respingerilor electrostatice dintre moleculele de proteină având ca urmare agregarea moleculelor și deci formarea de precipitat. Micșorarea respingerilor electrostatice se obține prin:

- aducerea pH-ului soluției în apropierea punctului izoelectric al proteinelor;
- mărirea forței ionice a soluției;
- modificarea constantei dielectrice a mediului.

## PRECIPITAREA CU SĂRURI NEUTRE

În cazul precipitărilor cu săruri neutre (mărirea forței ionice a soluției) alegerea unei anumite sări este condiționată de următorii factori: sarea nu trebuie să reacționeze chimic cu proteina, trebuie să aibă o solubilitate mare pentru a permite dizolvarea unor concentrații ridicate, să nu modifice pH-ul soluției în care se dizolvă, solubilitatea să nu varieze prea mult cu temperatura și să poată fi separată ușor atît de proteina precipitată, cît și de cea rămasă în soluție.

Sărurile neutre folosite în acest scop sînt  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_3$ , etc. Dintre acestea  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , solid sau soluție saturată este cel mai folosit (datorită solubilității sale mari în apă).

Soluția saturată de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se prepară dizolvînd la 25°C 766,8 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  în 1 000 ml apă. Această soluție corespunde unei molarități de 4,1. Solubilitatea sulfatului de amoniu în apă variază destul de mult cu temperatura dată. În tabelul XIV sînt date cantitățile ‰ în funcție de t°.

Tabelul XIV

Soluții saturate de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  la diferite t°

| Temperatura<br>t°C | Grame de adăugat<br>la 100 ml apă | Grame în 1 000 ml<br>soluție |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| 0                  | 706,86                            | 514,72                       |
| 10                 | 730,53                            | 525,05                       |
| 20                 | 755,82                            | 536,34                       |
| 25                 | 766,80                            | 541,24                       |
| 30                 | 777,55                            | 545,88                       |

Gradul de saturare în sulfat de amoniu se exprimă în mod obișnuit sub forma unei saturări procentuale.

Valoarea soluției saturate de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  este considerată 100%, gradul de saturare a unei soluții cu un anumit procent de saturare se calculează după ecuația:

$$X = \frac{100 (S_2 - S_1)}{100 - S_2}$$

X = volumul soluției saturate de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  care trebuie adăugat la soluția cu grad de saturare  $S_1$ .

$S_1$  = saturarea soluției existente

$S_2$  = saturarea de realizat

Exemplu: la o soluție cu saturare de 30%  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , pentru a realiza o saturare de 70%  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  se adaugă o cantitate din soluția saturată de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  calculată după formula de mai sus:

$$X = \frac{100 (70 - 30)}{100 - 70} = 133 \text{ ml}$$

Fracționarea cu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a proteinelor plasmatice se face după schema din fig. 2.

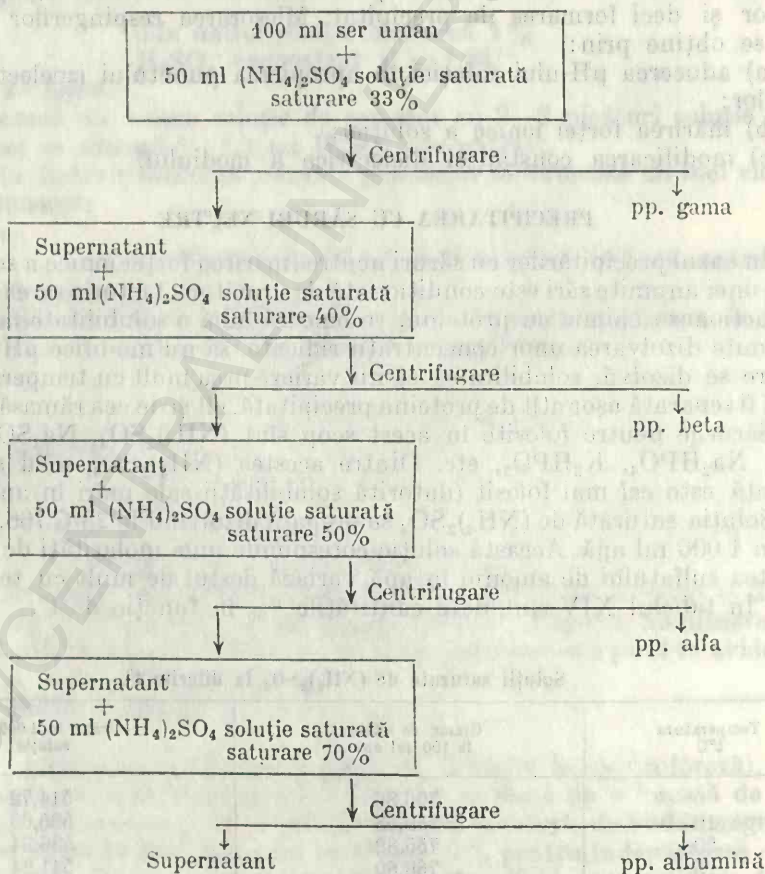


Fig. 2. — Fracționarea serului uman cu soluție saturată de sulfat de amoniu.



Variațiile mici de volum obținute prin îndepărtarea precipitatelor nefiind luate în considerare, saturațiile date sînt aproximative. Pentru corelarea erorilor și mărirea preciziei metodei de fracționare cu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  și totodată pentru evitarea unor calcule privind cantitățile de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ce trebuie adăugate în scopul izolării proteinelor plasmatice se folosește tabelul XV. În tabel sînt date cantitățile de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solid necesare pentru obținerea soluțiilor de diferite grade de saturare.

Tabelul XV

Obținerea soluțiilor de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  cu diferite grade de saturare

|                                                                                     |    | g(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> la % soluție                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Concentrația inițială a (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , % saturat | 0  | 56                                                                            | 114 | 144 | 176 | 196 | 209 | 243 | 277 | 313 | 315 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 | 662 | 767 |     |
|                                                                                     | 10 |                                                                               | 57  | 86  | 118 | 137 | 150 | 183 | 216 | 251 | 288 | 326 | 365 | 406 | 449 | 494 | 592 | 694 |     |
|                                                                                     | 20 |                                                                               |     | 29  | 59  | 78  | 91  | 123 | 155 | 189 | 225 | 262 | 300 | 340 | 382 | 424 | 520 | 619 |     |
|                                                                                     | 25 |                                                                               |     |     | 30  | 49  | 62  | 94  | 125 | 158 | 193 | 230 | 267 | 307 | 348 | 390 | 495 | 583 |     |
|                                                                                     | 30 |                                                                               |     |     |     | 19  | 30  | 62  | 94  | 127 | 162 | 198 | 235 | 273 | 314 | 356 | 449 | 546 |     |
|                                                                                     | 33 |                                                                               |     |     |     |     | 12  | 43  | 74  | 107 | 142 | 177 | 214 | 252 | 292 | 333 | 426 | 522 |     |
|                                                                                     | 35 |                                                                               |     |     |     |     |     | 31  | 63  | 94  | 129 | 164 | 200 | 238 | 278 | 319 | 411 | 506 |     |
|                                                                                     | 40 |                                                                               |     |     |     |     |     |     | 31  | 63  | 97  | 132 | 168 | 205 | 245 | 285 | 375 | 469 |     |
|                                                                                     | 45 |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     | 32  | 65  | 99  | 134 | 171 | 210 | 250 | 339 | 431 |     |
|                                                                                     | 50 |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     | 33  | 66  | 101 | 137 | 176 | 214 | 302 | 392 |     |
|                                                                                     | 55 |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 33  | 67  | 103 | 141 | 179 | 264 | 353 |     |
| 60                                                                                  |    |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 34  | 69  | 105 | 143 | 227 | 314 |     |     |
| 65                                                                                  |    |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 34  | 70  | 107 | 190 | 275 |     |     |
| 70                                                                                  |    |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 35  | 72  | 153 | 237 |     |     |
| 75                                                                                  |    |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 36  | 115 | 198 |     |
| 80                                                                                  |    |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 77  | 157 |
| 90                                                                                  |    |                                                                               |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 79  |
|                                                                                     |    | 10                                                                            | 20  | 25  | 30  | 33  | 35  | 40  | 45  | 50  | 55  | 60  | 65  | 70  | 75  | 80  | 90  | 100 |     |
|                                                                                     |    | Concentrația finală a (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , sol.% |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Exemplu: se cere prepararea unei soluții cu concentrația de 70%, plecînd de la o soluție cu concentrația de 33%; se caută pe coloana orizontală cifra 70 iar pe cea verticală (stînga) cifra 33. La intersecția celor două linii cu originea în punctele 70 și 33 se află cifra 252, ceea ce înseamnă că 252 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  trebuie adăugate la 1 litru soluție 33%, pentru obținerea unei soluții cu concentrație de 70%.

Soluția proteică este tratată cu cantitatea fixată de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (soluție saturată) sau substanța solidă în porțiuni mici sub agitare.

Amestecul este lăsat în repaus cel puțin 25—30 minute, după care se centrifughează la 3 000—7 000 ture/min. Prin centrifugare se separă supernatantul de precipitat care se reia în apă, urmînd apoi desalifierea. Faza bogată în proteină „precipitatul” — conține sare și apă puțină, iar partea bogată în apă „supernatantul” — conține multă sare și foarte puține proteine. Folosirea  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  în metoda de fracționare a proteinelor plasmatice are și dezavan-

taje. Prezența azotului sub forma ionului de amoniu nu permite determinarea concentrației proteice prin analiza azotului și de asemenea nu permite determinarea concentrației proteice prin metoda biuretului.

Pentru îndepărtarea acestor inconveniente, după precipitarea cu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se impune efectuarea dializei. În apele de dializă prezența  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se pune în evidență cu reactivul Nessler, pentru gruparea  $\text{NH}_4$  și cu soluție de  $\text{BaCl}_2$  10% pentru gruparea  $\text{SO}_4$ . În afară de dializă îndepărtarea  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se mai poate efectua prin gel filtrarea probei respective pe o coloană de Sephadex G-25. Prin eluarea probei cu apă distilată, proteina desalifiată este eluată prima, fiind urmată apoi de sarea neutră.

Fracțiunile proteice, albumina,  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ -globulinele obținute prin precipitarea serului cu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nu reprezintă un înalt grad de puritate, acest lucru realizându-se în cazul proteinelor cu solubilități diferite.

### FRACȚIONAREA CU SOLVENȚI ORGANICI

În cazul precipitărilor cu solvenți organici alegerea agenților de precipitare este condiționată de următorii factori: măsura în care scade constanta dielectrică a mediului, solubilitatea în apă (capacitatea de deshidratare a proteinelor), acțiunea denaturantă asupra proteinelor precipitate. Solvenții organici folosiți în acest scop sînt: alcool (etanol și metanol), acetona și eterul. Dintre acești agenți de precipitare cel mai folosit este etanolul.

Precipitarea prin solvenți organici (alcool) la rece ( $0^\circ$  sau sub  $0^\circ$ ) elimină atât inconvenientul cantităților mari de săruri în cazul precipitării cu săruri neutre, cit și inconvenientul denaturării proteinelor.

Aceste substanțe micșorînd constanta dielectrică, măresc în mod corespunzător atracțiile columbiene între moleculele proteice unindu-le și formînd astfel precipitarea proteinelor la concentrații ionice (saline) mai mici.

Precipitarea fracționată a proteinelor dintr-un amestec se realizează prin creșterea concentrației de etanol și ajustarea corespunzătoare a pH-ului în apropierea punctelor izoelectrice ale proteinelor folosindu-se soluții tampon cu menținerea puterii ionice la o valoare scăzută. Pentru protejarea proteinelor în timpul tratării, temperaturile se mențin scăzute în funcție de cantitățile de alcool, după cum se arată în tabelul XVI.

Tabelul XVI

Temperatura în funcție de cantitatea solventului organic

| Cantitatea de alcool % (V/V)                | 8    | 10   | 15   | 18   | 25    | 40  |
|---------------------------------------------|------|------|------|------|-------|-----|
| Punctul de temperatură ( $^\circ\text{C}$ ) | -2,6 | -3,4 | -5,4 | -6,8 | -10,7 | -23 |

Pentru fracționarea proteinelor plasmatiche cu alcool sînt binecunoscute condițiile care determină precipitarea. În tabelul XVII sînt date condițiile de precipitare a proteinelor plasmatiche cu alcool  $96^\circ$  la rece.



## Fraționarea proteinelor cu alcool

| Plasmă     | Fibrinogen | $\gamma$ | $\alpha$ | $\beta$ | Albumine |
|------------|------------|----------|----------|---------|----------|
| Proteină % | 5,1%       | 3%       | 1,6%     | 1%      | 0,8%     |
| Alcool 96° | 8—10%      | 25%      | 40%      | 40%     | 40%      |
| pH         | 7—7,2      | 6,8      | 5,2      | 5,8     | 4,8      |
| f i        | 0,14       | 0,09     | 0,09     | 0,09    | 0,11     |
| t°         | —3°C       | —5°C     | —5°C     | —5°C    | —5°C     |

Din tabelul XVII se remarcă faptul că pentru a separa 2 factori menținând constantă temperatura și concentrația solventului trebuie variat pH-ul.

Prin schimbarea pH-ului cu mai puțin de o unitate are loc apariția fenomenului de precipitare și deci separarea unei proteine. Acest fapt demonstrează că punctul izoelectric al proteinelor plasmatice variază considerabil, motiv pentru care fracționarea cu alcool trebuie să înceapă la un pH mai mare decât cel mai alcalin punct izoelectric al componentelor proteice din amestec și apoi să scadă treptat.

Fracțiunile obținute prin precipitare cu alcool sînt mult mai pure față de cele obținute prin precipitarea cu săruri neutre, dar metoda necesită instalații speciale pentru realizarea de temperaturi joase și nu poate fi aplicată cu ușurință. Ea constituie un procedeu industrial de fracționare a proteinelor plasmatice.

Obținerea alcoolului de diferite grade se poate efectua conform tabelului XIX. Pentru obținerea alcoolului de 60% plecînd de la unul de 95% se procedează astfel: se caută pe coloana orizontală cifra 95 iar pe cea verticală 60. La intersecția celor două linii se află cifra 63. Deci prin amestecarea a 100 ml alcool 95% cu 63 ml apă se obține alcool de 60%.

Obținerea alcoolului de diferite grade se poate realiza și mai simplu, conform datelor din tabelul XVIII.

La 1 volum de apă se adaugă volume diferite de alcool.

Tabelul XVIII

## Obținerea alcoolului de diferite grade

| Concentrația %   | 50%    | 66%    | 75%    | 80%    | 84%    | 86%    | 88%    | 90%    |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Alcool 96°       | 1 vol. | 2 vol. | 3 vol. | 4 vol. | 5 vol. | 6 vol. | 7 vol. | 8 vol. |
| H <sub>2</sub> O | 1 vol. | 1 vol. | 1 vol. | 1 vol. | 1 vol. | 1 vol. | 1 vol. | 1 vol. |



|    | 90     | 85     | 80     | 75     | 70     | 65     | 60     | 55     | 50     |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 85 | 6,56   |        |        |        |        |        |        |        |        |
| 80 | 13,79  | 6,83   |        |        |        |        |        |        |        |
| 75 | 21,89  | 14,48  | 7,20   |        |        |        |        |        |        |
| 70 | 31,10  | 23,14  | 15,35  | 7,64   |        |        |        |        |        |
| 65 | 41,53  | 33,03  | 24,66  | 16,37  | 8,15   |        |        |        |        |
| 60 | 53,65  | 44,48  | 35,44  | 26,47  | 17,88  | 8,76   |        |        |        |
| 55 | 67,87  | 57,90  | 48,07  | 38,32  | 28,63  | 19,02  | 9,47   |        |        |
| 50 | 84,71  | 73,90  | 63,04  | 52,43  | 41,73  | 31,25  | 20,47  | 10,35  |        |
| 45 | 105,34 | 93,30  | 81,38  | 69,54  | 57,78  | 46,09  | 34,46  | 22,90  | 11,41  |
| 40 | 130,80 | 117,34 | 104,01 | 90,76  | 77,58  | 64,48  | 51,43  | 38,46  | 25,55  |
| 35 | 163,28 | 148,01 | 132,88 | 117,82 | 102,84 | 87,93  | 70,08  | 58,31  | 43,59  |
| 30 | 206,22 | 188,57 | 171,05 | 153,53 | 136,34 | 118,94 | 101,71 | 84,54  | 67,45  |
| 25 | 266,12 | 245,15 | 224,30 | 203,61 | 182,83 | 162,21 | 141,65 | 121,16 | 100,73 |
| 20 | 355,80 | 329,84 | 304,01 | 278,26 | 252,58 | 226,98 | 201,43 | 175,96 | 150,55 |
| 15 | 505,27 | 471,00 | 436,85 | 402,81 | 368,83 | 334,91 | 301,07 | 267,29 | 233,64 |
| 10 | 804,50 | 753,65 | 702,89 | 652,21 | 601,60 | 551,06 | 500,50 | 450,19 | 399,85 |

#### MĂSURILE DE PRECAUȚIE PENTRU EVITAREA DENATURĂRII PROTEINELOR

Denaturarea proteinelor presupune dezorganizarea structurii moleculei, datorită ruperii legăturii dintre catenele polipeptidice și deplierea acestor catene. În funcție de caracterul acțiunii agentului denaturant, catenele polipeptidice devenite libere pot rămâne desfășurate sau se pot plia din nou cu formarea unei structuri specifice foarte apropiate sau chiar identice cu cea nativă sau pot forma o structură nouă diferită de cea nativă.

Denaturarea se poate pune în evidență prin schimbarea următoarelor proprietăți fizico-chimice și biologice ale fracțiunii:

- 1) scăderea solubilității
- 2) pierderea capacității de cristalizare
- 3) modificarea proprietăților optice (birefringența și absorbția în U.V.)
- 4) creșterea viscozității
- 5) modificarea proprietăților electroproteice (viteza de migrare, punct izoelectric)
- 6) schimbarea capacității de a adsorbi molecule mici (coloranți, ioni, lipide etc.)
- 7) creșterea sensibilității la acțiunile enzimelor
- 8) pierderea specificității biologice.

Măsurile de precauție care trebuie luate indiferent de tehnicile folosite și de natura chimică a proteinei sînt:

##### 1) Controlul temperaturii

Proteinele se denaturează în general la temperaturi mai mari de 45—50°C. De asemenea alternarea temperaturii scăzute cu cea din laborator (înghețare-

de diferite grade

|    | 100    | 99     | 98     | 97     | 96     | 95     | 94     | 93     | 92     |
|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 95 | 6,50   | 5,15   | 3,83   | 2,53   | 1,25   |        |        |        |        |
| 90 | 13,25  | 11,83  | 10,43  | 9,07   | 7,73   | 6,41   | 5,10   | 3,80   | 2,54   |
| 85 | 20,54  | 19,25  | 17,58  | 16,15  | 14,73  | 13,33  | 1,96   | 10,59  | 9,24   |
| 80 | 28,59  | 27,01  | 25,47  | 23,95  | 22,45  | 20,95  | 19,49  | 18,04  | 16,61  |
| 75 | 37,58  | 35,90  | 34,28  | 32,67  | 31,08  | 29,52  | 27,97  | 26,43  | 24,94  |
| 70 | 47,75  | 45,98  | 44,25  | 42,54  | 40,85  | 39,18  | 37,53  | 35,89  | 34,27  |
| 65 | 59,37  | 57,49  | 55,63  | 53,81  | 52     | 50,22  | 48,45  | 46,70  | 44,96  |
| 60 | 72,82  | 70,80  | 68,80  | 66,85  | 64,92  | 63     | 61,10  | 59,21  | 57,33  |
| 55 | 88,60  | 86,42  | 84,28  | 82,16  | 80,06  | 77,99  | 75,93  | 73,88  | 71,85  |
| 50 | 107,44 | 105,08 | 102,75 | 100,44 | 98,15  | 95,89  | 93,64  | 91,41  | 89,19  |
| 45 | 130,26 | 127,67 | 125,11 | 122,57 | 120,06 | 117,57 | 115,09 | 112,64 | 110,18 |
| 40 | 158,56 | 155,68 | 152,84 | 150,02 | 147,22 | 144,46 | 141,70 | 138,95 | 146,23 |
| 35 | 194,63 | 191,39 | 188,19 | 185,01 | 181,85 | 178,71 | 175,60 | 172,49 | 169,39 |
| 30 | 242,38 | 238,67 | 234,99 | 231,33 | 227,70 | 224,08 | 220,49 | 216,90 | 213,33 |
| 25 | 308,90 | 304,52 | 300,18 | 295,86 | 291,56 | 287,28 | 283,02 | 278,77 | 274,53 |
| 20 | 403,50 | 403,13 | 397,79 | 392,47 | 387,17 | 381,90 | 376,64 | 371,40 | 367,94 |
| 15 | 574,75 | 567,43 | 560,53 | 553,55 | 546,59 | 539,66 | 532,74 | 525,83 | 518,94 |
| 10 | 907,09 | 896,73 | 886,40 | 887,10 | 865,15 | 855,55 | 845,31 | 835,08 | 824,86 |

dezghețare), cu toate că nu provoacă denaturarea majorității proteinelor, totuși nu se recomandă.

## 2) Controlul pH-ului

pH-ul maximei stabilități a majorității proteinelor este în jurul neutralității și nu în jurul pH-ului izoelectric.

Trebuie evitate extremitățile acide și alcaline ale pH-ului.

3) **Seleționarea substanțelor chimice** întrebuințate la izolarea proteinelor este obligatorie, alegindu-se cele mai inofensive.

4) **Concentrația agentului de fracționare** are de asemenea o importanță mare în fracționarea proteinelor.

5) **Evitarea manipularilor cu efect denaturant:** spumarea soluțiilor proteice cauzează denaturări considerabile. Majorarea de asemenea produce deformări mecanice sau ruperea catenelor polipeptidice. La adăugarea reactivilor (acizi, baze, săruri) solvenți organici este necesar să se evite formarea exceselor locale, care duc la denaturare. Adăugarea reactivilor trebuie efectuată întotdeauna picătură cu picătură sub agitare lentă.

Folosirea ultrasunetelor pentru ruperea structurii celulare poate determina denaturarea proteinelor cu dimensiuni moleculare mari. Se iau precauțiuni pentru limitarea frecvenței generatorilor (maxim 900 Hz) cit și pentru eliminarea efectului termic.

6) **Blocarea enzimelor proteolitice** constă în adăugarea de acid  $\epsilon$ -aminocaproic 3g% și bromat de potasiu 0,1% cit și în manipulari la temperatura scăzută.

7) **Asigurarea sterilității preparatului:** în acest scop preparatul final trebuie să fie filtrat prin filtru Seitz, sau să se adauge substanțe bactericide (mertiolat de sodiu 1‰, azidă de sodiu 1‰).



[illegible]

## SOLUȚII, TAMPOANE, INDICATORI

## SOLUTII

O soluție este un amestec omogen de 2 sau mai multe substanțe.

Substanțele ce compun soluția nu sînt perceptibile cu ochiul sau cu microscopul și nici nu sînt separabile prin mijloace mecanice: filtrare sau centrifugare.

La soluții se disting 2 componente: „solventul“ cea care dizolvă — și „solutul“, cea care se dizolvă.

Soluțiile pot fi clasificate:

1. — După starea lor fizică:

- a) soluții gazoase — gaz în gaz (aer)

- b) soluții lichide { lichid în lichid (etanol în apă)  
gaz în lichid ( $\text{CO}_2$  în apă)  
solid în lichid ( $\text{ClNa}$  în apă)

- c) solutii solide — solid în solid (aliaje)

2. — După comportarea solutului la dizolvare:

- a) soluții de electroliți (electrolitii sînt substanțe care în stare dizolvată sau topită conduc curentul electric, datorită disocierii lor în ioni);

- b) soluții de neelectroliți — în care solutul se găsește sub formă de moleculă sau asociații de molecule. În laboratorul clinic în marea majoritate se folosesc soluțiile lichide de electroliți sau de neelectroliți. Solventul cel mai întrebuintat în practica laboratorului este apa distilată.

Apa distilată se obține prin: distilarea apei de robinet într-un distilator metalic. În acest caz conține elemente metalice ca: Zn, Cu, Sn, Pb.

Prin redistilarea apei distilate în distilator constituit numai din vase de sticlă neutră (fără dopuri de cauciuc sau plută) se obține apa bidistilată. Fierberea se face moderat în prezența unei cantități foarte mici de  $\text{KMnO}_4$  și  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Adăugarea acestor substanțe se face cu scopul de a oxida și în felul



acesta de a îndepărta substanțele organice eventual prezente în apa ce urmează a fi distilată.

Controlul apei bidistilate constă în următoarele probe:

1. — Reziduu: pe o sticlă de ceas tarată se pun 2 ml apă. Se evaporă la  $105^{\circ}$ , se răcește și se cântărește din nou. Cifra obținută prin diferența celor 2 cântăriri se înmulțește cu 50 pentru exprimarea rezultatelor % ml. Apa bidistilată este lipsită de reziduu.

2. — pH = 5,6 — 6,2

3. — Substanțe organice: într-un Erlenmeyer se pun 50 ml apă bidistilată și 0,5 ml acid sulfuric 10%. Se încălzește la fierbere, se adaugă o picătură dintr-o soluție de permanganat de potasiu 1%. Culoarea violacee trebuie să persiste timp de 3 minute.

4. — Substanțe anorganice:

a) Clorurile: la 10 ml apă distilată se adaugă o picătură de acid azotic 10% și 3—4 picături dintr-o soluție 1% nitrat de argint. În lipsa clorului nu se formează clorura de argint și deci amestecul nu prezintă opalescență.

b) Sulfatii: la 10 ml apă distilată se adaugă 2 picături acid clorhidric concentrat și 2 picături dintr-o soluție clorură de bariu 10%. În lipsa  $\text{SO}_4^{2-}$  nu se formează sulfat de bariu și deci amestecul nu prezintă opalescență.

c) Calciul: la 10 ml apă distilată se adaugă 1 ml soluție oxalat de amoniu 4%. În lipsa calciului nu se formează oxalatul de calciu și deci amestecul nu prezintă opalescență.

d) Cuprul: se pune în evidență cu reactivul Mayer. La 10 ml apă se adaugă 4 picături reactiv Mayer și o picătură de apă oxigenată. Prezența cuprului dă o tentă roz care trece în roșu. Viteza de apariție a tentei depinde de cantitatea de cupru din probă.

### CONCENTRAȚIA UNEI SOLUȚII

Raportul dintre solut și solvent definește concentrația unei soluții. Expri-  
marea concentrației se poate face în mai multe feluri:

1) Concentrația procentuală de masă: (g/g)

g de solut la 100 g soluție

2) Concentrația procentuală la volum: (g/v)

g de solut la 100 ml soluție

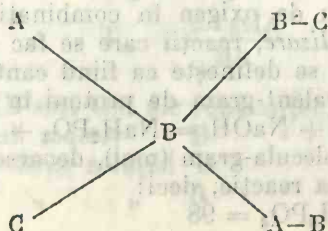
3) Concentrația procentuală în volum: (v/v)

ml (v) solut la 100 ml soluție

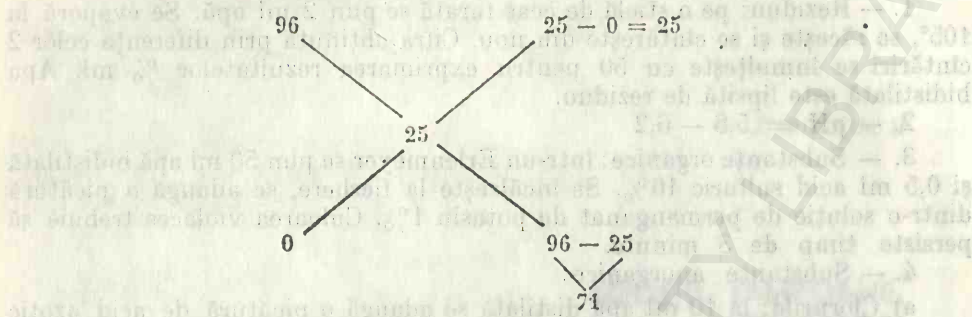
Pentru calcularea diferitelor volume se utilizează

„Regula amestecurilor”

Formula care se folosește în acest scop este următoarea:



**Exemplu:** Se cere prepararea unei soluții de alcool 25% (B) din alcool 96%(A).  
Prin aplicarea formulei, 25 ml alcool 96% trebuie să fie diluați  
cu 71 ml apă distilată.



**4) Concentrația molară sau molaritate: (M)**

moli de solut la litru soluție (Moli/vol)

(Un rol important reprezintă cantitatea în grame dintr-o substanță egală numeric cu greutatea moleculară a substanței).

**5) Concentrația molară la molaritate (moli/g):** (foarte puțin folosită)

moli de solut la 1 000 g soluție

**6) Concentrația normală sau normalitate: (N) sau (n)**

echivalent — gram de solut la litru de soluție

Cunoscind normalitatea soluției se poate calcula cantitatea de substanță conținută într-un litru soluție prin formula:

$$g \text{ substanță/l} = \frac{GM}{P} \times N$$

unde GM = greutatea moleculară a substanței

P = valența (nr. de electroni, de ioni de H, de oxidril sau echivalentul acestora cu care reacționează substanța respectivă în reacție).

N = normalitatea

Și invers, cunoscind cantitatea de substanță într-un litru de soluție, se poate calcula ușor normalitatea N acelei soluții, după relația:

$$N = \frac{P \cdot g \text{ subs./l}}{GM}$$

**ECHIVALENT-GRAM**

Un echivalent-gram este cantitatea dintr-un element radical sau moleculă exprimată în grame care se combină cu un atom-gram hidrogen (1,008 g H) sau cu jumătate atom-gram oxigen (8 g O), sau care poate înlocui aceste cantități de hidrogen sau de oxigen în combinațiile lor.

În reacțiile de neutralizare, reacții care se fac cu schimburi de protoni (H<sup>+</sup>), un echivalent-gram se definește ca fiind cantitatea de substanță care reacționează cu un echivalent-gram de protoni în reacția respectivă.

1. În reacția:  $H_3PO_4 + NaOH = NaH_2PO_4 + H_2O$ , echivalentul pentru  $H_3PO_4$  este identic cu molecula-gram (mol), deoarece doar unul din ioni de H ai acidului participă la reacție, deci:

$$G_{Ma} \ H_3PO_4 = 98$$



$$\text{Echivalentul-gram} = \frac{98}{1} = 98.$$

2. În reacția  $\text{H}_3\text{PO}_4 + 2\text{NaOH} = \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ , echivalentul gram este egal cu jumătatea moleculei gram, deoarece în această reacție participă doi ioni de H.

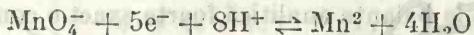
$$\text{Echivalentul-gram} = \frac{98}{2} = 49.$$

3. În reacția  $\text{Ca(OH)}_2 + 2\text{HCl} = \text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$  — echivalentul  $\text{Ca(OH)}_2$  va fi egal cu jumătatea moleculei-gram, deoarece în reacție s-au consumat 2 echivalenți-gram de clor (sau au fost înlocuiți 2 oxidril) GM a  $\text{Ca(OH)}_2 = 74,09$

$$\text{Echivalentul-gram} = \frac{74,09}{2} = 37,045$$

În reacțiile de oxido-reducere un echivalent gram se definește prin cantitatea de substanță care reacționează cu un electron-gram ( $5,49 \cdot 10^{-4}$  g).

$2\text{KMnO}_4 + 5(\text{COOH})_2 + 3\text{H}_2\text{SO}_4 = 2\text{MnSO}_4 + 10\text{CO}_2 + 8\text{H}_2\text{O}$  permanganatul de potasiu în mediu acid reacționează cu  $5\text{e}^-$ , conform reacției:



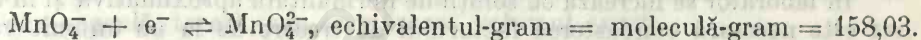
$$\text{GM a } \text{KMnO}_4 = 158,03$$

$$\text{echivalentul-gram} = \frac{\text{molecula-gram}}{5} = \frac{158,03}{5} = 31,606$$

Permanganatul de potasiu în mediu neutru reacționează cu un singur electron:

$$\text{MnO}_4^- + 3\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{MnO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \text{ și deci echivalentul-gram} = \frac{158,03}{3} = 52,68$$

Permanganatul în mediu puternic alcalin reacționează cu un singur electron:



3.  $\text{SbCl}_3 + \text{KIO}_3 + 6\text{HCl} = 3\text{SbCl}_5 + \text{KI} + 3\text{H}_2\text{O}$ , echivalentul-gram pentru  $\text{KIO}_3$  este  $= \frac{214,02}{6} = 35,67$ , pentru că iodul de la  $\text{I}^{5+}$  din iodat trece în  $\text{I}^-$  din iodură primind  $6\text{e}^-$ .

În general pentru calculul echivalentului-gram se ține neapărat seama de reacția chimică ce are loc.

7) Titrul soluțiilor (T). Titrul unei soluții este cantitatea de substanță exprimată în grame, conținută într-un mililitru de soluție. El se stabilește în raport cu substanța cu care se titrează conform formulei:

$$T_A = \frac{Z \cdot T_B \cdot M_A}{M_B}$$

Ma, MB sint GM ale substanței A și B

Z = ml reactiv B

T<sub>B</sub> = titrul soluției B

T<sub>A</sub> = " " A



Exemplu: titrarea  $H_3PO_4$  cu NaOH pînă la fosfat secundar:



$$GM \text{ NaOH} = 40$$

$$GM \text{ } H_3PO_4 = 98$$

NaOH are titrul = 0,004852, iar la titrare s-au folosit 25,80 ml.

$$\text{Cantitatea de } H_3PO_4 = \frac{0,004852 \times 2580 \times 98}{2 \times 40} = 0,15339$$

Cunoscîndu-se titrul unei soluții se poate afla normalitatea (N) soluției după formula:

$$N = \frac{T \times 100}{\text{echivalent-gram}}$$

### SOLUȚII TITRATE

Soluții ale căror concentrații se cunosc exact, sînt soluții titrate, celelalte sînt aproximative.

Prepararea unei soluții titrate se face în 2 feluri:

a) Se cîntărește la balanța analitică foarte exact o cantitate din substanță și se dizolvă în balon cotat.

b) Atunci cînd substanța respectivă nu se poate cîntări exact se prepară întîi soluția, care apoi e titrată cu ajutorul unei alte soluții de referință preparată prin cîntărire exactă.

— pentru evitarea unor erori prea mari se iau următoarele precauții: 1) stabilirea titrului unei soluții se va face direct cu substanța etalon și nu cu ajutorul altei soluții, căreia la rîndul său i s-a stabilit titrul cu ajutorul unei substanțe etalon; 2) dacă titrul unei soluții s-a stabilit în prezența unui anumit indicator, atunci pentru titrările cu această soluție se va folosi același indicator; 3) pentru stabilirea titrului sînt necesare cel puțin 2 titrări în scopul verificării concordanței dintre rezultate. Cu cît numărul de determinări va fi mai mare, cu atît se va stabili mai exact.

În laborator se lucrează cu soluții de normalitate aproximativă și în acest caz este necesară cunoașterea factorului de trecere de la un anumit volum din soluția de normalitate aproximativă la soluția de normalitate exactă.

Se presupune o soluție de NaOH cu titrul = 0,004328, adică o soluție mai concentrată decît aceea  $10^{-1}$  N care are titrul = 0,0040.

Cum 0,0040 g NaOH echivalează cu 1 ml soluție exactă  $10^{-1}$  N, 0,004328 g echivalează cu  $\frac{0,004328}{0,004} = 1,0820$  ml. Acest număr, care arată corespondența dintre 1 ml soluție aproximativ normală și o soluție exact normală, se numește factor (F). Deci:

$$F = \frac{T_{\text{real}}}{T_{\text{teoretic}}}$$

În general, dacă se cunoaște F și normalitatea N a soluției cu care se titrează (soluția substanței B), se poate afla cantitatea de substanță A din soluția care se titrează după relația

$$g \text{ substanța A} = \frac{N \cdot F \cdot V \cdot M_A}{1000}, \text{ unde}$$

$M_A$  — greutatea moleculară substanței A (care se titrează)  
 $V$  — volumul soluției subst. B folosit la titrare.

Obținerea unei soluții exact normale dintr-o soluție aproximativ normală cu  $F > 1$  (deci mai concentrat) se poate face prin diluare, conform formulei:

$$X = \frac{V \times F \times 10^{-p}}{1\,000 \times T} \text{ ml, unde:}$$

$X$  = volumul soluției cu normalitate aproximativă care urmează a fi diluată

$G$  = echivalentul-gram al substanței care formează soluția

$V$  = volumul soluției care urmează a fi obținut

$10^{-p}$  = normalitatea soluției

$T$  = titrul soluției aproximative.

*Exemplu:*

Avem o soluție de NaOH 0,1 N ( $10^{-1}$ N) aproximativă cu  $T = 0,0044$  ( $F = 1,1$ ) și din care trebuie să se obțină 500 ml de soluție NaOH  $10^{-1}$ N exactă, atunci:

$$X = \frac{500 \times 40 \times 10^{-1}}{1\,000 \times 0,0044} = 454,5 \text{ ml}$$

Deci 454,5 ml de soluție NaOH  $10^{-1}$ N aproximativă vor fi diluate în balon cotat până la 500 ml cu apă distilată, pentru a obține o soluție de NaOH  $10^{-1}$ N exactă.

#### SOLUȚII TITRATE CURENT FOLOSITE ÎN LABORATORUL CLINIC

Prepararea unei soluții în laboratorul clinic se face respectând următoarele reguli:

1. — Se cântărește exact la balanța analitică substanța pe o sticlă de ceas sau capsulă, tarată, sau se măsoară volumul exact.

2. — Solventul sau diluantul este apă distilată fiartă și răcită pentru eliminarea  $\text{CO}_2$ .

3. — Vasul pentru prepararea soluției titrate este balonul cotat.

4. — Substanța cântărită se trece în balon cotat cu ajutorul unei pilnii, avându-se grijă ca sticla de ceas sau capsula să fie bine spălate cu apă deasupra unei pilnii, plasate în gura balonului cotat, pentru a nu se pierde din substanță.

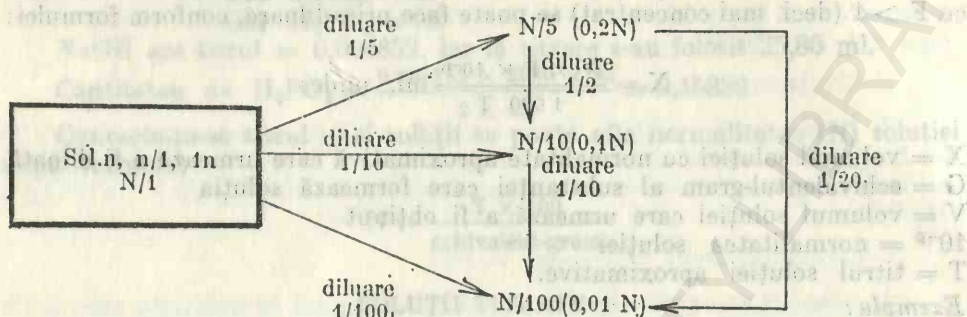
5. — Substanța se dizolvă în prima etapă într-o cantitate mică de apă, apoi se aduce la semn.

6. — Controlul concentrației soluției respective se verifică cu soluții de referință prin titrare și se ajustează la normalitate exactă sau se calculează factorul. În cazul în care normalitatea nu este exactă se poate calcula titrul soluției sau se poate corecta normalitatea în felul următor:

a) la soluții mai diluate se adaugă o cantitate din soluția inițială concentrată și se va retitra;



b) soluțiile mai concentrate se vor dilua cu apă conform schemei de mai jos și de asemenea se vor retitra



În laboratorul clinic soluțiile uzuale sînt cele normale sau centinormale, notate N, N/10, N/100 ... etc. sau N, 0,1N, 0,01N... etc.

Soluțiile normale sînt obținute prin:

1. — dizolvarea unei cantități calculate de substanță,
2. — prin diluarea unei soluții inițial mai concentrate.

Calculul volumului necesar se face ținîndu-se cont de concentrația soluției inițiale, de densitatea soluției și de gramele de substanță necesară pentru obținerea soluției de lucru. Se dă mai jos un exemplu de calcul valabil pentru soluțiile concentrate livrate comercial. Toate datele necesare pentru acest calcul, inclusiv greutatea moleculară a substanței pentru calculul echivalențului-gram se găsesc scrise pe eticheta flaconului respectiv.

*Soluția de acid sulfuric N ( $H_2SO_4N$ )*

Concentrația soluției de  $H_2SO_4N$  este de 49,04 g $^{100}$ . Calculul pentru a obține soluția de  $H_2SO_4$  N din soluția de  $H_2SO_4$  concentrat 98% (g/g;  $d = 1,84$ ) este următorul:

$$\begin{array}{ll} 98 \text{ g } H_2SO_4 & \dots\dots\dots 100 \text{ g soluție} \\ 49,09 \text{ g } H_2SO_4 & \dots\dots\dots X \text{ g soluție} \end{array}$$

$$X = \frac{100 \times 49,09}{98} = 50 \text{ g soluție.}$$

Transformarea gramelor în mililitri se face conform formulei:

$$\text{densitatea} = \frac{\text{masa}}{\text{volum}}$$

$$v = \frac{m}{d}$$

deci:

$$v = \frac{50}{1,84} = 27,2 \text{ ml.}$$

49,04 g  $H_2SO_4$  sînt conținute în 27,2 ml soluție 98% care diluați cu precauție pînă la 1 000 ml dau soluția de  $H_2SO_4N$ . Precauția constă în turnarea  $H_2SO_4$  concentrat peste 500 ml apă cu răcire continuă, iar după răcire se completează la 1 000 ml.



### *Titrarea soluției de $H_2SO_4$ N*

În balon Erlenmayer se măsoară 10 ml  $H_2SO_4$  din soluția de verificat și 2 ml indicator roșu de metil 0,2% în alcool 70%. Amestecul se încălzește și se titrează cu soluție de NaOH N până la obținerea culorii galben-roz.

În cazul în care pentru 10 ml din soluția de verificat s-au utilizat 11,2 ml NaOH N, la 100 ml trebuie adăugat 112 ml apă distilată. Soluția se verifică din nou.

### *Soluția de acid sulfuric 0,1 N ( $H_2SO_4$ 0,1 N)*

Concentrația soluției de  $H_2SO_4$  0,1 N este de 4,90 g  $H_2SO_4$ ‰ ml. Soluția de  $H_2SO_4$  0,1 N se obține prin diluarea soluției de  $H_2SO_4$  N.

Într-un balon cotate de 1 000 ml se toarnă 100 ml  $H_2SO_4$  N și se aduce la semn de apă distilată. Diluția obținută va fi titrată cu o soluție de NaOH 0,1 N în prezența roșului de metil ca indicator. Se aduce la normalitate exactă sau se calculează titrul.

### *Acid clorhidric normal (HCl) N*

Concentrația soluției de HCl 1 N este de 36,46 g HCl‰ ml. HCl concentrat p.a. este aproximativ 10 N.

În cazul HCl (37% D.119), 36,46 g HCl sînt conținute în 83,4 ml HCl concentrat (conform calculului din exemplu), care sînt transvazați cu precauție într-un balon cotate de 1 000 ml balonul conținînd numai 500 ml apă distilată. După ce amestecul se răcește, se completează la semn. Soluția este titrată cu soluții perfect normale de  $Na_2CO_3$  sau NaOH în prezența roșului de metil ca indicator.

### *Acid clorhidric 0,1 N (HCl 0,1 N)*

Concentrația soluției de HCl 0,1 N este de 3,64 g‰. Soluția se prepară prin diluarea a 100 ml HCl N în balon cotate de 1 000 ml completîndu-se cu apă distilată pînă la semn. Titrarea se face cu o soluție de NaOH 0,1 N sau  $Na_2CO_3$  0,1 N în prezența roșului de metil ca indicator.

### *Hidroxidul de sodiu normal (NaOH) N*

Concentrația soluției de NaOH N este de 40 g NaOH‰ ml. Se cîntăresc repede 40 g NaOH p.a. care se trec într-un balon cotate de 1 000 ml. Se adaugă 500 ml apă fiartă și răcită pentru îndepărtarea  $CO_2$ .

Se agită în baie de apă rece pînă la completa dizolvare și apoi se aduce la 1 000 ml cu apă distilată fiartă și răcită.

Soluția de NaOH liberă de carbonat se titrează cu soluție de acid oxalic normal (soluție de referință) în prezența indicatorului fenolftaleină, pînă la virajul slab roz, sau cu soluție de HCl și  $H_2SO_4$  cu normalitate exactă în prezența indicatorului metil orange (1% în apă) pînă la virajul portocaliu.

Soluțiile de hidroxid de sodiu 0,1 N ..... N/1000 se fac prin diluarea corespunzătoare a soluției normale. Controlul va fi făcut pe soluții verificate de acizi cu aceeași normalitate.

### *Tiosulfat de sodiu 0,1 N ( $Na_2S_2O_3$ 0,1 N)*

Concentrația soluției de  $Na_2S_2O_3$  0,1 N este de 25 g  $Na_2S_2O_3 \cdot 5 H_2O$  la ‰ ml.

Soluția se păstrează mai bine la rece și întuneric. În vederea unei conservări de lungă durată, se poate adăuga una din substanțele următoare în cantitatea respectivă: 0,2 g  $Na_2CO_3$ , 10 mg  $HgI_2$ , 100 mg Ag (CN) $_2$  la ‰ ml soluție. De asemenea și alcoolul amilic 1% este un bun conservant. Titrul se stabilește cu soluție de iodat de K 0,1 N ( $KIO_3$ ) în mediu acid în prezența amidonului ca indicator.

### *Titrare soluției de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N*

În balon se măsoară 25 ml  $\text{KIO}_3$  0,1 N

10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%

40 ml  $\text{KI}$  10%

Amestecul se titrează cu soluție de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 N până la culoarea galbenă. Se adaugă 2 picături indicator (soluție de amidon 1% în soluție saturată de  $\text{NaCl}$ ). Dacă soluția devine albastră se continuă titrarea picătură cu picătură până la decolorare. În funcție de rezultat se aduce soluția la normalitate exactă sau se calculează titrul care este variabil și trebuie stabilit pentru fiecare întrebuințare.

### *Permanganat de potasiu 0,1 N ( $\text{KMnO}_4$ 0,1 N)*

Concentrația soluției de  $\text{KMnO}_4$  0,1 N este de 3,16 g  $\text{KMnO}_4$  % ml. După 10—15 zile de la preparare se completează cu apă la 1 000 ml și se titrează cu o soluție de acid oxalic 0,1 N în mediu acidificat cu acid sulfuric, la cald.

### *Titrare soluției de $\text{KMnO}_4$ 0,1 N*

În balon se măsoară:

10 ml acid oxalic 0,1 N

40 ml acid sulfuric 20%

Amestecul se titrează la cald cu soluția de  $\text{KMnO}_4$  0,1 N până la culoarea roz. Culoarea roz apărută la sfârșitul reacției trebuie să persiste 30 secunde. Se ajustează normalitatea sau se calculează titrul care este variabil și trebuie stabilit la fiecare întrebuințare.

### *Sulfocianura de potasiu 0,1 N ( $\text{KSCN}$ 0,1 N)*

Concentrația soluției de  $\text{KSCN}$  0,1 N este de 9,72 g % ml. Substanța se cântărește exact și se dizolvă în 1 000 ml apă distilată la balon cotelat. Se verifică cu soluția  $\text{AgNO}_3$  0,1 N indicator sulfat dublu de  $\text{Fe}$  și  $\text{NH}_4$ .

### *Titrare soluției de $\text{KSCN}$ 0,1 N*

În balon se măsoară:

10 ml  $\text{AgNO}_3$  0,1 N

20 ml  $\text{H}_2\text{O}$

5 ml apă în indicator sulfat dublu de  $\text{Fe}$  și  $\text{NH}_4$ , 5% în apă.

Amestecul se titrează cu soluția de  $\text{KSCN}$  0,1 N până la culoarea roșu-portocaliu care persistă 30 secunde. În funcție de rezultatele obținute se ajustează normalitatea sau se calculează factorul.

### *Sulfocianura de amoniu 0,1 N ( $\text{NH}_4\text{SCN}$ 0,1 N)*

Concentrația soluției de  $\text{NH}_4\text{SCN}$  0,1 N este de 7,61 g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  % ml. 7,61 g  $\text{NH}_4\text{SCN}$  cântărite exact sînt dizolvate în 1 000 ml apă distilată la balon cotelat. Se verifică cu  $\text{AgNO}_3$  N/10 în mediul acid azotic, indicator sulfat dublu de  $\text{Fe}$  și  $\text{NH}_4$  soluție 5%.

### *Nitrat de argint 0,1 N ( $\text{AgNO}_3$ 0,1 N)*

Concentrația soluției de  $\text{AgNO}_3$  0,1 N este de 16,98 g  $\text{AgNO}_3$  cântărite exact se dizolvă în 1 000 ml apă distilată la balon cotelat. Titrul se determină față de o soluție de  $\text{NaCl}$  0,1 N în prezența cromatului de potasiu 5% în apă. Colorația roșu-brun indică sfârșitul titrării. Soluția se păstrează în sticle negre.

### *Soluții de referință*

Soluțiile de referință folosite în practică sînt:

1) acid oxalic — pentru verificarea concentrației soluțiilor alcaline ( $\text{NaOH}$  etc.)



2) carbonatul de sodiu — pentru verificarea soluțiilor de acizi ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ..... etc.)

3) iodatul de potasiu pentru verificarea soluției de tiosulfat de sodiu

4)  $\text{NaCl}$ . — pentru verificarea concentrației soluției de  $\text{AgNO}_3$ .

Acid oxalic  $N$ . ( $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) concentrația soluției de acid oxalic  $N$  este de 63,034 g‰.

Se cîntăresc repede și exact 15,756 g  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  care se dizolvă în apă distilată în balon cotate de 250 ml. În prezența de 2—3 picături de cloroform se poate conserva 3—4 luni. Fiind însă soluție de referință este bine să fie cît mai proaspătă.

Carbonatul de sodiu 0,1  $N$  ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1  $N$ ) concentrația soluției de carbonat de calciu 0,1  $N$  este de 5,2997  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  g‰.

Se cîntăresc 7 g bicarbonat de sodiu ( $\text{NaHCO}_3$ ) în creuzet de porțelan tarat și se încălzește la roșu slab ( $270^\circ\text{C}$ — $300^\circ\text{C}$ ) timp de 1 oră. Se lasă să se răcească într-un exicator, se cîntărește și se repetă încălzirea pînă la greutate constantă, obținindu-se astfel carbonatul de sodiu anhidru. Se cîntărește foarte exact și se dizolvă în 1 000 ml apă distilată. Se completează cu apă în volum proporțional, pentru cantitatea teoretică de 5,2997 g ‰.

Iodat de potasiu 0,1  $N$  ( $\text{KIO}_3$  0,1  $N$ ) = 214,02 (soluții de referință)

Concentrația soluției de iodat de  $K$  0,1  $N$  este 3,567 g‰.

Se ține iodatul de potasiu 24 ore în exicator pe  $\text{CaCl}_2$  la întuneric și apoi se cîntăresc 3,567 g  $\text{KIO}_3$  care sînt dizolvate în 200 ml apă distilată fiartă și răcită. Se transvazează în balon cotate și se completează la 1 000 ml apă distilată.

Clorura de sodiu 0,1 ( $\text{NaCl}$  0,1  $N$ ) concentrația soluției de  $\text{NaCl}$  este de 5,8  $\text{NaCl}$  ‰.

În scopul eliminării apei clorura se încălzește într-o capsulă sau creuzet la temperatura de  $500$ — $600^\circ\text{C}$  pînă la greutatea constantă. Apoi se cîntărește repede 5,8  $\text{NaCl}$  deoarece substanța este higroscopică și se dizolvă în 1 000 ml apă distilată. Soluția se conservă sterilizată prin autoclavare sau în prezența a 2—3 picături de cloroform.

## SOLUȚII TAMPON

Soluția tampon este un amestec dintr-un acid slab și sarea rezultată dintr-un acid slab cu o bază tare sau un amestec dintr-o bază slabă și sarea rezultată dintr-o bază slabă cu un acid tare.

Proprietatea principală a soluțiilor tampon este aceea de a se opune variațiilor mari ale  $\text{pH}$ -ului la adaosul de cantități mici de acizi tari cu baze tari. Condițiile impuse la prepararea soluțiilor tampon sînt:

1. Reactivii foarte puri, iar în cazul sărurilor anhidre acestea se usucă 4—6 ore la  $105$ — $110^\circ\text{C}$  după care sînt răcite în exicator înainte de cîntărire.

2. Se folosește apă distilată, bidistilată sau deionizată, iar în cazul soluțiilor diluate apa se fierbe pentru îndepărtarea  $\text{CO}_2$  (solubilizat în apă).

3. Substanțele se cîntăresc la balanță analitică în cazul soluțiilor diluate. În cazul soluțiilor stoc se cîntăresc la balanță farmaceutică.



4. pH-ul tamponelor se verifică cu pH-metrul, cu o soluție tampon etalon la temperatura la care se utilizează tamponul.

5. Păstrarea tamponelor se face sub formă de soluții concentrate la  $+4^{\circ}\text{C}$  diluția efectuându-se în momentul întrebuintării.

6. Tamponele se păstrează în prezență de substanțe conservante, în cazul folosirii lor pentru determinare de enzime; acestea sînt lipsite de substanțe conservante și se recomandă păstrarea sub formă înghețată.

În tabelele ce urmează se dau o serie de soluții tampon după Sörense, Clark, Lubs, Walpole, McIlvain, Michaelis, Briton și Rotinson cu valorile corespunzătoare ale pH-ului.

#### *Soluțiile tampon după Sörensen*

Soluțiile stoc din care se obțin sistemele tampon glicocol-acid clorhidric, glicocol-hidrat de sodiu sînt:

Soluția glicocol 0,1 M

|                                             |           |
|---------------------------------------------|-----------|
| $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ..... | 7,60 g    |
| $\text{NaCl}$ .....                         | 5,85 g    |
| $\text{H}_2\text{O}$ .....                  | 1 000 ml. |

Soluția acid clorhidric 0,1 M

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| $\text{HCl}$ (37%) .....   | 8,4 ml   |
| $\text{H}_2\text{O}$ ..... | 1 000 ml |

Soluția hidrat de sodiu 0,1 M

|                            |          |
|----------------------------|----------|
| $\text{NaOH}$ .....        | 4 g      |
| $\text{H}_2\text{O}$ ..... | 1 000 ml |

*Tabelul XX*

**Tampon glicocol — acid clorhidric 0,1 M**

| Glicocol 0,1 M | Acid clorhidric 0,1 M | pH tampon | Glicocol 0,1 M | Acid clorhidric 0,1 M | pH tampon |
|----------------|-----------------------|-----------|----------------|-----------------------|-----------|
| —              | —                     | —         | 5,0            | 5,0                   | 1,93      |
| —              | —                     | —         | 6,0            | 4,0                   | 2,28      |
| 1              | 9,0                   | 1,15      | 7,0            | 3,0                   | 2,61      |
| 2,0            | 8,0                   | 1,25      | 8,0            | 2,0                   | 2,92      |
| 3,0            | 7,0                   | 1,42      | 9,0            | 1,0                   | 3,34      |
| 4,0            | 6,0                   | 1,65      | 9,5            | 0,5                   | 3,68      |

**Tampon glicocol — hidrat de sodiu 0,1 M**

| Glicocol | $\text{NaOH}$ 0,1 M | pH tampon | Glicocol 0,1 M | $\text{NaOH}$ 0,1 M | pH tampon |
|----------|---------------------|-----------|----------------|---------------------|-----------|
| —        | —                   | —         | 5,0            | 5,0                 | 11,30     |
| 9,5      | 0,5                 | 8,57      | 4,9            | 5,1                 | 11,56     |
| 9,0      | 1,0                 | 8,93      | 4,5            | 5,5                 | 12,09     |
| 8,0      | 2,0                 | 9,36      | 4,0            | 6,0                 | 12,40     |
| 7,0      | 3,0                 | 9,72      | 3,0            | 7,0                 | 12,67     |
| 6,0      | 4,0                 | 10,14     | 2,0            | 8,0                 | 12,86     |
| 5,5      | 4,5                 | 10,48     | 1,0            | 9,0                 | 12,97     |
| 5,1      | 4,9                 | 11,07     | —              | 10,0                | 13,06     |

# Tampon fosfat M/15

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului fosfat disodic-monosodic M/15 sint:

fosfat disodic 0,07 M

fosfat disodic ..... 11,87 g  
apă distilată ..... 1 000 ml

fosfat monosodic 0,07 M

fosfat monosodic ..... 9,078 g  
apă distilată ..... 1 000 ml

Tabelul XXI

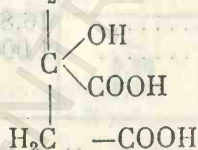
## Tampon fosfat 0,07 M

| Fosfat disodic M/15 | Fosfat monopotasic M/15 | p H amestec | Fosfat disodic M/15 | Fosfat monopotasic M/15 | p H amestec |
|---------------------|-------------------------|-------------|---------------------|-------------------------|-------------|
| 0,25                | 9,75                    | 5,29        | 5,0                 | 5,0                     | 6,81        |
| 0,5                 | 9,5                     | 5,59        | 6,0                 | 4,0                     | 6,98        |
| 1,0                 | 9,0                     | 5,91        | 7,0                 | 3,0                     | 7,17        |
| 2,0                 | 8,0                     | 6,24        | 8,0                 | 2,0                     | 7,38        |
| 3,0                 | 7,0                     | 6,47        | 9,0                 | 1,0                     | 7,73        |
| 4,0                 | 6,0                     | 6,64        | 9,5                 | 0,5                     | 8,04        |

Soluțiile stoc folosite la prepararea tampoanelor citrat-acid clorhidric și citrat-hidroxid de sodiu sint:

soluția citrat de sodiu 0,1 N

acid citric  $\rightarrow$  H<sub>2</sub>O — COOH



H<sub>2</sub>O ..... 21,008 g

hidroxid

de sodiu  $\rightarrow$  NaOH

H<sub>2</sub>O

..... 4 g

..... 1 000 ml

soluția HCl 0,1 N

HCl(37%)

H<sub>2</sub>O

..... 0,4 ml

..... 1 000 ml

soluția NaOH 0,1 N

NaOH

H<sub>2</sub>O

..... 4 g

..... 1 000 ml

## Tampon citrat — acid clorhidric

| Citrat de Na<br>0,1 M | Acid clorhidric<br>0,1 M | pH<br>tampon | Citrat<br>0,1 M | Acid clorhidric<br>0,1 M | pH tampon |
|-----------------------|--------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-----------|
| —                     | —                        | —            | 5,0 ml          | 5,0 ml                   | 3,69      |
| —                     | 10,0 ml                  | 1,04         | 5,5 ml          | 4,5 ml                   | 3,95      |
| 1,0 ml                | 9,0 ml                   | 1,17         | 6,0 ml          | 4,0 ml                   | 4,16      |
| 2,0 ml                | 8,0 ml                   | 1,42         | 7,0 ml          | 3,0 ml                   | 4,45      |
| 3,0 ml                | 7,0 ml                   | 1,92         | 8,0 ml          | 2,0 ml                   | 4,65      |
| 3,33 ml               | 6,67 ml                  | 2,27         | 9,0 ml          | 1,0 ml                   | 4,83      |
| 4,0 ml                | 6,0 ml                   | 2,97         | 9,5 ml          | 0,5 ml                   | 4,89      |
| 4,5 ml                | 5,5 ml                   | 3,36         | 10,0 ml         | —                        | 4,96      |
| 4,75 ml               | 5,25 ml                  | 3,53         | —               | —                        | —         |

## Tampon citrat-NaOH

| Citrat de Na<br>0,1 M | Acid clorhidric<br>0,1 M | pH<br>tampon | Citrat<br>0,1 M | NaOH<br>0,1 M | pH tampon |
|-----------------------|--------------------------|--------------|-----------------|---------------|-----------|
| —                     | —                        | —            | 6,0 ml          | 4,0 ml        | 5,97      |
| 9,5 ml                | 0,5 ml                   | 5,02         | 5,5 ml          | 4,5 ml        | 6,33      |
| 9,0 ml                | 1,0 ml                   | 5,11         | 5,25 ml         | 4,75 ml       | 6,68      |
| 8,0 ml                | 2,0 ml                   | 5,51         | 4,5 ml          | 5,5 ml        | 12,07     |
| 7,0 ml                | 3,0 ml                   | 5,57         | 4,0 ml          | 6,0 ml        | 12,37     |

## Soluții tampon după Clark și Lubs

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului clorură de potasiu — acid clorhidric 0,1 M sînt:

soluția clorură de potasiu 0,2 N

KCl ..... 15 g

H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția HCl 0,2 N

HCl (37%) ..... 16,8 ml

H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml.

## Soluții tampon. Clorură de potasiu-acid clorhidric

| Clorură de potasiu<br>0,2 N | Acid clorhidric<br>0,2 N |                                     | pH<br>tampon | Clorură de potasiu<br>0,2 N | Acid clorhidric<br>0,2 N |                                     | pH tampon |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------------|-----------|
| —                           | —                        | Se aduce la 200 ml cu apă distilată | —            | —                           | —                        | Se aduce la 200 ml cu apă distilată | —         |
| 50 ml                       | 64,5                     | "                                   | 1,2          | 50 ml                       | 16,6                     | "                                   | 1,6       |
| 50 ml                       | 41,5                     | "                                   | 1,4          | 50 ml                       | 10,6                     | "                                   | 2,0       |
| 50 ml                       | 26,3                     | "                                   | 1,6          | 50 ml                       | 6,7                      | "                                   | 2,2       |



Soluțiile stoc folosite la prepararea tampoanelor borat-acid clorhidric și borathidrat de sodiu sînt:

soluția de borat 0,1 N

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| B(OH) <sub>3</sub> ..... | 12,404 g |
| NaOH .....               | 4 g      |
| H <sub>2</sub> O .....   | 1 000 ml |

soluția HCl 0,1 N

|                        |          |
|------------------------|----------|
| HCl 37% .....          | 8,4 ml   |
| H <sub>2</sub> O ..... | 1 000 ml |

soluția de NaOH 0,1 N

|                        |          |
|------------------------|----------|
| NaOH .....             | 4 g      |
| H <sub>2</sub> O ..... | 1 000 ml |

Tabelul XXIV

Tampon borat — acid clorhidric 0,1 N

| Borat<br>0,1 N | Acid clorhidric<br>0,1 N | pH<br>tampon | Borat<br>0,1 N | Acid clorhidric<br>0,1 N | pH<br>tampon |
|----------------|--------------------------|--------------|----------------|--------------------------|--------------|
| —              | —                        | —            | 7,5 ml         | 2,5 ml                   | 8,80         |
| 5,25 ml        | 4,75 ml                  | 7,62         | 8,0 ml         | 2,0 ml                   | 8,91         |
| 5,5 ml         | 4,5 ml                   | 7,94         | 8,5 ml         | 1,5 ml                   | 9,01         |
| 5,75 ml        | 4,25 ml                  | 8,14         | 9,0 ml         | 1,0 ml                   | 9,09         |
| 6,0 ml         | 4,0 ml                   | 8,29         | 9,5 ml         | 1,5 ml                   | 9,16         |
| 6,5 ml         | 3,5 ml                   | 8,50         | 10,0 ml        | —                        | 9,24         |
| 7,0 ml         | 3,0 ml                   | 8,68         | —              | —                        | —            |

Tampon borat — NaOH

| Borat<br>0,1 N | NaOH<br>0,1 N | pH<br>tampon | Borat<br>0,1 N | NaOH<br>0,1 N | pH<br>tampon |
|----------------|---------------|--------------|----------------|---------------|--------------|
| —              | —             | —            | 7,0 ml         | 3,0 ml        | 9,67         |
| 9,0 ml         | 1,0 ml        | 9,36         | 6,0 ml         | 4,0 ml        | 9,97         |
| 8,0 ml         | 2,0 ml        | 9,50         | 4,0 ml         | 6,0 ml        | 12,37        |

Soluțiile stoc folosite la prepararea tampoanelor ftalat-acid clorhidric și ftalathidrat de sodiu sînt:

soluția ftalat-acid de K 0,2 N

|                        |          |
|------------------------|----------|
| ftalat-acid de K ..... | 41 g     |
| H <sub>2</sub> O ..... | 1 000 ml |

soluția HCl 0,2 N

|                        |          |
|------------------------|----------|
| HCl 37% .....          | 16,8 ml  |
| H <sub>2</sub> O ..... | 1 000 ml |

soluția NaOH 0,2 N

|                        |          |
|------------------------|----------|
| NaOH .....             | 8 g      |
| H <sub>2</sub> O ..... | 1 000 ml |

Tabelul XXV

## Tampon ftalat — acid clorhidric

| Ftalat<br>0,2 N | Acid clorhidric<br>0,2 N |                                                | pH<br>tampon | Ftalat<br>0,2 N | Acid clorhidric<br>0,2 N |                                                | pH<br>tampon |
|-----------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------|-----------------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------|
| —               | —                        | Se aduce<br>la 200 ml<br>cu apă dis-<br>tilată | —            | —               | —                        | Se aduce<br>la 200 ml<br>cu apă dis-<br>tilată | —            |
| 50 ml           | 46,70                    | "                                              | 2,2          | 50 ml           | 14,70                    | "                                              | 3,2          |
| 50 ml           | 39,60                    | "                                              | 2,4          | 50 ml           | 9,90                     | "                                              | 3,4          |
| 50 ml           | 32,95                    | "                                              | 2,6          | 50 ml           | 5,97                     | "                                              | 3,6          |
| 50 ml           | 26,42                    | "                                              | 2,8          | 50 ml           | 2,63                     | "                                              | 3,8          |
| 50 ml           | 20,32                    | "                                              | 3,0          |                 |                          |                                                |              |

## Tampon ftalat — NaOH

| Ftalat | NaOH<br>0,2 N |                                            | pH tampon<br>0,2 N | Ftalat | NaOH<br>0,2 N |                                            | pH tam-<br>pon |
|--------|---------------|--------------------------------------------|--------------------|--------|---------------|--------------------------------------------|----------------|
| —      | —             | Adus la<br>200 ml cu<br>apă disti-<br>lată | —                  | —      | —             | Adus la<br>200 ml cu<br>apă disti-<br>lată | —              |
| 50 ml  | 0,40          | "                                          | 4,0                | 50 ml  | 29,95         | "                                          | 5,2            |
| 50 ml  | 3,70          | "                                          | 4,2                | 50 ml  | 35,45         | "                                          | 5,4            |
| 50 ml  | 7,50          | "                                          | 4,4                | 50 ml  | 39,85         | "                                          | 5,6            |
| 50 ml  | 12,15         | "                                          | 4,6                | 50 ml  | 43,00         | "                                          | 5,8            |
| 50 ml  | 17,70         | "                                          | 4,8                | 50 ml  | 45,45         | "                                          | 6,0            |
| 50 ml  | 23,85         | "                                          | 5,0                | 50 ml  | 47,00         | "                                          | 6,2            |

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului fosfat—NaOH sint:  
soluția fosfat monopotasic 0,2 N

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 27,24 g

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

soluția NaOH 0,2 N

NaOH ..... 8 g

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml.

Tabelul XXVI

## Tampon fosfat — NaOH

| Fosfat<br>0,2 N | NaOH<br>0,2 N |                                            | pH  | Fosfat<br>0,2 N | NaOH<br>0,2 N |                                            | pH  |
|-----------------|---------------|--------------------------------------------|-----|-----------------|---------------|--------------------------------------------|-----|
| —               | —             | Adus la<br>200 ml cu<br>apă disti-<br>lată | —   | —               | —             | Adus la<br>200 ml cu<br>apă disti-<br>lată | —   |
| 50 ml           | 3,72          | "                                          | 5,8 | 50 ml           | 29,63         | "                                          | 7,0 |
| 50 ml           | 5,70          | "                                          | 5,0 | 50 ml           | 35,00         | "                                          | 7,2 |
| 50 ml           | 8,60          | "                                          | 6,2 | 50 ml           | 39,50         | "                                          | 7,4 |
| 50 ml           | 12,60         | "                                          | 6,4 | 50 ml           | 42,80         | "                                          | 7,6 |
| 50 ml           | 17,80         | "                                          | 6,6 | 50 ml           | 45,20         | "                                          | 7,8 |
| 50 ml           | 23,65         | "                                          | 6,8 | 50 ml           | 46,80         | "                                          | 8,0 |

Soluțiile stoc folosite pentru prepararea tamponului acid boric-clorură de potasiu sint:

soluția clorură de potasiu-acid boric 0,2 N

A) HCl ..... 15 g  
B ..... 12,4 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția hidrat de sodiu 0,2 N

B) NaOH ..... 8 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

Tabelul XXVII

Tampon acid boric-clorură de potasiu-hidrat de sodiu: 50 ml sol. A + x ml sol. B, se aduce la 200 ml cu H<sub>2</sub>O distilată

| NaOH (sol. B) | pH Tampon |
|---------------|-----------|
| 2,61          | 7,8       |
| 3,97          | 8,0       |
| 5,00          | 8,2       |
| 8,50          | 8,4       |
| 12,00         | 8,6       |
| 16,30         | 8,8       |
| 21,30         | 9,0       |
| 26,70         | 9,2       |
| 33,00         | 9,4       |
| 36,85         | 9,6       |
| 40,80         | 9,8       |
| 43,90         | 10,0      |

### Soluții tampon după Walpole

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului acid acetic-acetat de sodiu — după Walpole — sint:

soluția acetat de sodiu 0,2 N

acetat de sodiu ..... 16,4 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția acid acetic 0,2 N

acid acetic glacial ..... 12 ml  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

Tabelul XXVIII

Tampon acid acetic 0,2 N — acetat de sodiu 0,2 N

| pH  | Acid acetic<br>0,2 N | Acetat de sodiu<br>0,2 N | pH  | Acid acetic<br>0,2 N | Acetat de sodiu<br>0,2 N |
|-----|----------------------|--------------------------|-----|----------------------|--------------------------|
| 3,6 | 0,185                | 0,015                    | 4,8 | 0,080                | 0,120                    |
| 3,8 | 0,176                | 0,024                    | 5,0 | 0,059                | 0,141                    |
| 4,0 | 0,164                | 0,036                    | 5,2 | 0,042                | 0,158                    |
| 4,2 | 0,147                | 0,053                    | 5,4 | 0,029                | 0,171                    |
| 4,4 | 0,126                | 0,074                    | 5,6 | 0,019                | 0,181                    |
| 5,7 | 0,102                | 0,098                    |     |                      |                          |



### Soluții tampon după McIlvain

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului fosfat-acid citric — după McIlvain — sint:

soluție fosfat de sodiu 0,2 N

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ..... 35,62 g

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

soluția acid citric 0,1 M

acid citric..... 21 g

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

Tabelul XXIX

#### Tampon fosfat-acid citric

| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$<br>0,2 N | Acid citric<br>0,1 N | pH  | $\text{Na}_2\text{HPO}_4$<br>0,2 N | Acid citric<br>0,1 N | pH   |
|------------------------------------|----------------------|-----|------------------------------------|----------------------|------|
| 0,40                               | 19,60                | 2,2 | 10,72                              | 9,28                 | 5,2  |
| 1,18                               | 18,76                | 2,4 | 11,15                              | 8,85                 | 5,4  |
| 2,18                               | 17,82                | 2,6 | 11,60                              | 8,40                 | 5,6  |
| 3,17                               | 16,83                | 2,8 | 12,09                              | 7,91                 | 5,8  |
| 4,11                               | 15,89                | 3,0 | 12,63                              | 7,37                 | 6,0  |
| 4,94                               | 15,06                | 3,2 | 13,22                              | 6,78                 | 6,2  |
| 5,70                               | 14,30                | 3,4 | 13,85                              | 6,15                 | 6,4  |
| 6,44                               | 13,56                | 3,6 | 14,55                              | 5,45                 | 6,6  |
| 7,10                               | 12,90                | 3,8 | 15,45                              | 4,55                 | 6,8  |
| 7,71                               | 12,29                | 4,0 | 16,47                              | 3,53                 | 7,0  |
| 8,28                               | 11,72                | 4,2 | 17,39                              | 2,61                 | 7,2  |
| 8,82                               | 11,18                | 4,4 | 18,17                              | 1,83                 | 7,4  |
| 9,35                               | 10,65                | 4,6 | 18,73                              | 1,27                 | 7,6  |
| 6,87                               | 10,14                | 4,8 | 19,15                              | 0,85                 | 7,8  |
| 10,30                              | 9,70                 | 5,0 | 19,45                              | 0,55                 | 8,00 |

### Soluții tampon după Michaelis

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului veronal-acid clorhidric — după Michaelis — sint:

A) dietil barbiturat de sodiu

(veronal de sodiu) ..... 20,6 g

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

B) soluție acid clorhidric

$\text{HCl}$  37% ..... 8,4 ml

$\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

Tabelul XXX

#### Tampon veronal-acid clorhidric

| Veronal Na (soluția A) | HCl (soluția B) | pH   |
|------------------------|-----------------|------|
| 5,10                   | 4,90            | 6,40 |
| 4,14                   | 4,86            | 6,60 |
| 5,22                   | 4,78            | 6,80 |
| 5,36                   | 4,64            | 7,00 |

| Veronal Na (soluția A) | HCl (soluția B) | pH   |
|------------------------|-----------------|------|
| 5,54                   | 4,46            | 7,20 |
| 5,81                   | 4,19            | 7,40 |
| 6,15                   | 3,85            | 7,60 |
| 6,62                   | 3,38            | 7,80 |
| 7,16                   | 2,84            | 8,00 |
| 7,69                   | 2,31            | 8,20 |
| 8,23                   | 1,77            | 8,40 |
| 8,71                   | 1,29            | 8,60 |
| 9,08                   | 0,92            | 8,80 |
| 9,36                   | 0,64            | 9,00 |
| 9,52                   | 0,48            | 9,20 |
| 9,74                   | 0,26            | 9,40 |
| 9,85                   | 0,15            | 9,60 |
| 9,93                   | 0,07            | 9,80 |

În continuare se dau formulele unor soluții tampon utilizate frecvent în laborator.

#### Tampon glicocol-acid clorhidric

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului glicocol-acid clorhidric sînt:

soluția glicocol 0,2 M

- A) glicocol ..... 15 g  
 $H_2O$  ..... 1 000 ml

soluția acid clorhidric 0,2 M

- B) HCl 37% ..... 16,8 ml  
 $H_2O$  ..... 1 000 ml  
 50 ml A + x ml B diluat la 200 ml apă distilată

Tabelul XXXI

#### Tampon glicocol-acid clorhidric

| ml soluție B | pH  |
|--------------|-----|
| 44,0         | 2,2 |
| 32,4         | 2,4 |
| 24,2         | 2,6 |
| 16,8         | 2,8 |
| 11,4         | 3,0 |
| 8,2          | 3,2 |
| 6,4          | 3,4 |
| 5,0          | 3,6 |

### Tampon acetat de sodiu-acid acetic

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului acetat de sodiu-acid acetic sînt:

soluția acid acetic 0,2 M

A)  $\text{CH}_3\text{—COOH}$  ..... 11,55 ml  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

soluția acetat de sodiu 0,2 M

B)  $\text{CH}_3\text{—COONa}$  ..... 16,5 ml  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

sau

$\text{CH}_3\text{—COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ..... 27 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

x ml A + y ml B diluat la 100 ml cu apă distilată.

Tabelul XXXII

### Tampon acetat de sodiu-acid acetic

| x ml sol. A | y ml sol. B | pH  |
|-------------|-------------|-----|
| 46,3        | 3,7         | 3,6 |
| 44,0        | 6,0         | 3,8 |
| 41,0        | 9,0         | 4,0 |
| 36,8        | 13,2        | 4,2 |
| 30,5        | 19,5        | 4,4 |
| 25,5        | 24,5        | 4,6 |
| 20,0        | 30,0        | 4,8 |
| 14,8        | 35,2        | 5,0 |
| 10,5        | 39,5        | 5,2 |
| 8,8         | 41,2        | 5,4 |
| 4,8         | 45,2        | 5,6 |

Tabelul XXXIII

### Tampon fosfat (molarități diferite)

| Substanță                                                                 | Greutate moleculară G.M. | Cantitatea de substanță în grame necesară la 1 l apă pentru molaritățile |                               |                                |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
|                                                                           |                          | 1 M                                                                      | $\frac{M}{5} = 0,2 \text{ M}$ | $\frac{M}{10} = 0,1 \text{ M}$ | $\frac{M}{100} = 0,01 \text{ M}$ |
| Fosfat monosodic<br>$\text{NaH}_2\text{PO}_4$                             | 120                      | 120                                                                      | 24                            | 12                             | 1,2                              |
| Fosfat monosodic<br>$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ | 137,99                   | 138                                                                      | 27,6                          | 13,8                           | 1,38                             |
| Fosfat monosodic<br>$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 156                      | 156                                                                      | 31,2                          | 15,6                           | 1,56                             |
| Fosfat disodic<br>$\text{Na}_2\text{HPO}_4$                               | 141,96                   | 142                                                                      | 28,4                          | 14,2                           | 1,42                             |



| Sustanță                                                                | Greutate moleculară G.M. | Cantitatea de substanță în grame necesară la 1 l apă pentru molaritățile |                               |                                |                                  |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
|                                                                         |                          | 1 M                                                                      | $\frac{M}{5} = 0,2 \text{ M}$ | $\frac{M}{10} = 0,1 \text{ M}$ | $\frac{M}{100} = 0,01 \text{ M}$ |
| Fosfat disodic<br>$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  | 177,99                   | 178                                                                      | 35,6                          | 17,8                           | 1,78                             |
| Fosfat disodic<br>$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  | 268,07                   | 268,1                                                                    | 53,61                         | 26,8                           | 2,68                             |
| Fosfat disodic<br>$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  | 358,14                   | 358,1                                                                    | 71,62                         | 35,8                           | 3,58                             |
| Fosfat monopotasie<br>$\text{KH}_2\text{PO}_4$                          | 136,09                   | 136,1                                                                    | 27,22                         | 13,61                          | 1,361                            |
| Fosfat dipotasie<br>$\text{K}_2\text{HPO}_4$                            | 174,23                   | 174,23                                                                   | 34,85                         | 17,42                          | 1,74                             |
| Fosfat dipotasie<br>$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ | 192,23                   | 192,23                                                                   | 38,45                         | 19,22                          | 1,92                             |
| Fosfat dipotasie<br>$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  | 228,23                   | 228,23                                                                   | 45,65                         | 22,82                          | 2,28                             |

Pentru obținerea soluției tampon fosfat cu pH-ul necesar experimentului este obligatoriu ca molaritatea soluțiilor stoc care se vor amesteca în proporțiile date în tabelul XXXIII să fie egală.

Tabelul XXXIV

## Tampon fosfat

| Fosfat monosodic sau monopotasie ml | Fosfat disodic sau dipotasie ml | pH  | Fosfat monosodic sau potasie ml | Fosfat disodic sau dipotasie ml | pH  |
|-------------------------------------|---------------------------------|-----|---------------------------------|---------------------------------|-----|
| 96,9                                | 3,1                             | 5,4 | 50                              | 50                              | 6,8 |
| 95                                  | 5                               | 5,6 | 45                              | 55                              | 6,9 |
| 93,5                                | 6,5                             | 5,7 | 39                              | 61                              | 7   |
| 92                                  | 8                               | 5,8 | 33                              | 67                              | 7,1 |
| 90                                  | 10                              | 5,9 | 28                              | 72                              | 7,2 |
| 88                                  | 12                              | 6   | 23                              | 77                              | 7,3 |
| 85                                  | 15                              | 6,1 | 19,2                            | 80,8                            | 7,4 |
| 81,5                                | 18,5                            | 6,2 | 16                              | 84                              | 7,5 |
| 77,5                                | 22,5                            | 6,3 | 13                              | 87                              | 7,6 |
| 73,8                                | 26,2                            | 6,4 | 10,5                            | 90,5                            | 7,7 |
| 68,5                                | 31,5                            | 6,5 | 8,5                             | 91,5                            | 7,8 |
| 64                                  | 36                              | 6,6 | 7                               | 93                              | 7,9 |
| 56,5                                | 43,5                            | 6,7 | 5,5                             | 94,5                            | 8   |

### Tampon citrat-acetat de sodiu

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului citrat-acetat de sodiu sînt:

soluția acid citric 0,1 M

A) acid acetic ..... 21,01 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția citrat de sodiu 0,1 M

B) citrat de sodiu 2 H<sub>2</sub>O ..... 29,41 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml.

Tablul XXXV

### Tampon citrat-acetat de sodiu

x ml A + y ml B diluat la volum total de 100 ml cu apă distilată

| x ml sol. A | y ml sol. B | pH  |
|-------------|-------------|-----|
| 46,5        | 3,5         | 3,0 |
| 43,7        | 6,3         | 3,2 |
| 40,0        | 10,0        | 3,4 |
| 37,0        | 13,0        | 3,6 |
| 35,0        | 15,0        | 3,8 |
| 33,0        | 17,0        | 4,0 |
| 31,5        | 18,5        | 4,2 |
| 28,0        | 22,0        | 4,4 |
| 25,5        | 24,5        | 4,6 |
| 23,0        | 27,0        | 4,8 |
| 20,5        | 29,5        | 5,0 |
| 18,0        | 32,0        | 5,2 |
| 16,0        | 34,0        | 5,4 |
| 13,7        | 36,3        | 5,6 |
| 11,8        | 38,2        | 5,8 |
| 9,5         | 41,5        | 6,0 |
| 7,2         | 42,8        | 6,2 |

### Tampon citrat-fosfat

Soluțiile stoc folosite pentru prepararea tamponului citrat-fosfat sînt:

soluția acid citric 0,1 M

A) acid citric ..... 21,08 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția fosfat disodic 0,1 M

B) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O ..... 53,65 g

sau

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O ..... 71,7 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

**Tampon citrat-fosfat**  
 x ml A + y ml B diluat la 100 ml cu apă distilată

| x ml sol. A | y ml sol. B | pH  |
|-------------|-------------|-----|
| 44,6        | 5,4         | 2,6 |
| 42,2        | 7,8         | 2,8 |
| 39,8        | 10,2        | 3,0 |
| 37,7        | 12,3        | 3,2 |
| 35,9        | 14,1        | 3,4 |
| 33,9        | 16,1        | 3,6 |
| 32,3        | 17,7        | 3,8 |
| 30,7        | 19,3        | 4,0 |
| 29,4        | 20,6        | 4,2 |
| 27,8        | 22,2        | 4,4 |
| 26,7        | 23,3        | 4,6 |
| 25,2        | 24,8        | 4,8 |
| 24,3        | 25,7        | 5,0 |
| 23,3        | 26,7        | 5,2 |
| 22,2        | 27,8        | 5,4 |
| 21,0        | 29,0        | 5,6 |
| 19,7        | 30,3        | 5,8 |
| 17,9        | 32,1        | 6,0 |

**Tampon borat-acid boric**

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului borat-acid boric sint (după Politzsch):

A) soluția tetraborat de sodiu (borax)

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  ..... 19,10 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

soluția clorură de sodiu

B)  $\text{NaCl}$  ..... 2,92 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

soluția acid boric

C)  $\text{B}(\text{OH})_3$  ..... 12,40 g  
 soluție B ..... 1 000 ml

**Tampon borat-acid boric**  
 x ml soluție A + y ml soluție C

| x ml soluția A | y ml soluția C | pH   |
|----------------|----------------|------|
| 0,3            | 9,7            | 6,77 |
| 0,6            | 9,4            | 7,09 |
| 1              | 9              | 7,39 |
| 1,5            | 8,5            | 7,60 |
| 2              | 8              | 7,88 |
| 2,5            | 7,5            | 7,94 |
| 3              | 7              | 8,08 |
| 3,5            | 6,5            | 8,20 |
| 4              | 6              | 8,31 |
| 4,5            | 5,5            | 8,41 |
| 5              | 5              | 8,51 |
| 5,5            | 4,5            | 8,60 |
| 6              | 4              | 8,69 |
| 7              | 3              | 8,84 |
| 8              | 2              | 9,04 |
| 9              | 1              | 9,11 |
| 10             | 0              | 9,24 |



### Tampon borax-acid boric

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului borax sint:  
soluția acid boric 0,2 N

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| A) $B(OH)_3$ .....            | 12,4 g   |
| $H_2O$ .....                  | 1 000 ml |
| soluția borax 0,05 N          |          |
| B) borax.....                 | 19,10 g  |
| $H_2O$ .....                  | 1 000 ml |
| soluția hidrat de sodiu 0,2 N |          |
| C) NaOH .....                 | 8 g      |
| $H_2O$ .....                  | 1 000 ml |

Tabelul XXXVIII

### Tampon borat-acid boric

50 ml A + x ml B diluat la 200 ml cu apă distilată

| x ml. sol. B | pH  | x ml sol. B | pH  |
|--------------|-----|-------------|-----|
| 2,0          | 7,6 | 22,5        | 8,7 |
| 3,1          | 7,8 | 30,0        | 8,8 |
| 4,9          | 8,0 | 42,5        | 8,9 |
| 7,3          | 8,2 | 59,0        | 9,0 |
| 11,5         | 8,4 | 83,0        | 9,1 |
| 17,5         | 8,6 | 115,0       | 9,2 |

Tabelul XXXIX

### Tampon borat-NaOH

50 ml B + x ml C, diluat la 200 ml cu apă distilată

| x ml sol. C | pH   | x ml sol. B | pH   |
|-------------|------|-------------|------|
| 0,0         | 9,28 | 29,0        | 9,7  |
| 7,0         | 9,35 | 34,0        | 9,8  |
| 11,0        | 9,4  | 38,6        | 9,9  |
| 17,6        | 9,5  | 43,0        | 10,0 |
| 23,0        | 9,6  | 46,0        | 10,1 |

### Tampon TRIS maleat-NaOH

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului TRIS maleat-NaOH sint:

soluția TRIS-acid malic 0,2 M

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| A) hydroxymethylaminometan .. | 24,2 g   |
| acid malic .....              | 23,2 g   |
| sau                           |          |
| acid malic anhidru.....       | 19,6 g   |
| $H_2O$ .....                  | 1 000 ml |
| soluția hidrat de sodiu 0,2 M |          |
| B) NaOH .....                 | 8 g      |
| $H_2O$ .....                  | 1 000 ml |

## Tampon TRIS maleat-NaOH

50 ml A + x ml B diluat la 200 ml cu apă distilată

| x ml sol. B | pH  |
|-------------|-----|
| 7,0         | 5,2 |
| 10,8        | 5,4 |
| 15,5        | 5,6 |
| 20,5        | 5,8 |
| 26,0        | 6,0 |
| 31,5        | 6,2 |
| 37,0        | 6,4 |
| 42,5        | 6,6 |
| 45,0        | 6,8 |
| 48,0        | 7,0 |
| 51,0        | 7,2 |
| 54,0        | 7,4 |
| 58,0        | 7,6 |
| 63,5        | 7,8 |
| 69,0        | 8,0 |
| 75,0        | 8,2 |
| 81,0        | 8,4 |
| 86,5        | 8,6 |

## Tampon TRIS-HCl

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului TRIS-HCl sînt:

soluția TRIS 0,2 M

A) hydroxymethyl aminometan ... 24,2

H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția acid clorhidric 0,2 M

B) HCl 37% ..... 16,8 ml

H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

Tabelul XLI

## Tampon TRIS-HCl

50 ml A + x ml B diluat la 200 ml cu apă distilată

| x ml soluție B | pH  |
|----------------|-----|
| 44,2           | 7,2 |
| 41,4           | 7,4 |
| 38,4           | 7,6 |
| 32,5           | 7,8 |
| 26,8           | 8,0 |
| 21,9           | 8,2 |
| 16,5           | 8,4 |
| 12,2           | 8,6 |
| 8,1            | 8,8 |
| 5,0            | 9,0 |

### Tampon veronal-HCl

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului veronal (dietilbarbiturat de sodiu)—HCl sînt:

soluția veronal sodic 0,2 M

A) veronal sodic ..... 41,2 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția acid clorhidric 0,2 M

B) HCl 37% ..... 16,8 ml  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

Tabelul XLII

### Tampon veronal-HCl

50 ml A + ml B diluat la 200 ml cu apă distilată

| x ml soluție B | pH  |
|----------------|-----|
| 45,0           | 6,8 |
| 43,0           | 7,0 |
| 39,0           | 7,2 |
| 32,5           | 7,4 |
| 27,5           | 7,6 |
| 22,5           | 7,8 |
| 17,5           | 8,0 |
| 12,7           | 8,2 |
| 9,0            | 8,4 |
| 6,0            | 8,6 |
| 4,0            | 8,8 |
| 2,5            | 9,0 |
| 1,5            | 9,2 |

### Tampon glicocol-NaOH

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului glicocol-NaOH sînt:

soluția glicocol 0,2 M

A) glicocol ..... 15,01 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

soluția hidrat de sodiu 0,2 M

B) NaOH ..... 8 g  
H<sub>2</sub>O ..... 1 000 ml

Tabelul XLIII

### Tampon glicocol-NaOH

500 ml A + ml B diluat la 200 ml cu apă distilată

| x ml soluție B | pH   |
|----------------|------|
| 4,0            | 8,6  |
| 6,0            | 8,8  |
| 8,8            | 9,0  |
| 12,0           | 9,2  |
| 16,8           | 9,4  |
| 22,4           | 9,6  |
| 27,2           | 9,8  |
| 32,0           | 10,0 |
| 38,6           | 10,4 |
| 45,5           | 10,6 |



### Tampon carbonat-bicarbonat

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului carbonat-bicarbonat sînt:  
soluția carbonat de sodiu 0,2 M

A)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidru ..... 2,2 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

soluția bicarbonat de sodiu

B)  $\text{NaHCO}_3$  ..... 16,8 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

Tabelul XLIV

### Tampon carbonat-bicarbonat

x ml A + y ml B diluat la 200 ml cu apă distilată

| x ml soluția A | y ml soluția B | pH   |
|----------------|----------------|------|
| 4,0            | 46,0           | 9,2  |
| 7,5            | 42,5           | 9,3  |
| 9,5            | 40,5           | 9,4  |
| 13,0           | 37,0           | 9,5  |
| 16,0           | 34,0           | 9,6  |
| 19,5           | 30,5           | 9,7  |
| 22,0           | 28,0           | 9,8  |
| 25,0           | 25,0           | 9,9  |
| 27,5           | 22,5           | 10,0 |
| 30,0           | 20,0           | 10,1 |
| 33,0           | 17,0           | 10,2 |
| 35,5           | 14,5           | 10,3 |
| 38,5           | 11,5           | 10,4 |
| 40,5           | 9,5            | 10,5 |
| 42,5           | 7,5            | 10,6 |
| 45,0           | 5,0            | 10,7 |

### Tampon fosfat de sodiu-salin (PBS) 0,01 M

Soluțiile stoc folosite la prepararea tamponului PBS sînt:  
soluția fosfat monosodic 0,2 M

A)  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ..... 27,6 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

soluția fosfat disodic 0,2 M

B)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ..... 53,65 g

sau

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  ..... 71,63 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  ..... 1 000 ml

Pentru soluția tampon pH = 7

16 ml sol. A + 35,5 ml sol. B + 8,5 g NaCl aduse la 1 000 ml cu apă distilată.

Pentru soluția tampon pH 7,4

9,5 ml soluție A + 40,5 ml soluție B + 8,5 g NaCl adus la 1 000 ml cu apă distilată.

## FILTRAREA

Pentru conservarea soluțiilor tampon și a lichidelor biologice se impune filtrarea prin plăci Seitz. Filtrarea constă în trecerea soluțiilor de sterilizat printr-o placă poroasă care reține bacteriile și chiar virusurile de dimensiuni mari.

Principiul metodei se bazează pe reținerea microbilor și a virusurilor în spațiile substratului poros. Adsorbția particulelor din lichidul de filtrat este determinată de vâscozitate, temperatură, pH-ul soluțiilor, încărcarea electrică a particulelor și a filtrului.

În tabelul XLV sînt date tipurile de plăci filtrante și sterilizante cele mai folosite:

Tabelul XLV

| Plăci Seitz filtrante și sterilizante |                     |                                  |
|---------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Tip                                   | Dimensiunea porilor | Utilizare                        |
| K <sub>0</sub> — K <sub>6</sub>       | peste 1,4—0,7 μ     | clarificare                      |
| EK                                    | 1,4—0,7 μ           | clarificare                      |
| EKS                                   | 1,2—0,6 μ           | sterilizant pentru bacterii mari |
| EKS <sub>I</sub>                      | 1,0—0,5 μ           | sterilizant pentru bacterii mici |
| EKS <sub>II</sub>                     | 0,8—0,4 μ           | sterilizant pentru virusuri mari |

Tabelul XLVI

| Soluții izotonice                     |                     |                 |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------|
| Substanțe                             | Greutate moleculară | Gramme % ml apă |
| Clorură de amoniu                     | 53,50               | 0,8             |
| Clorură de calciu                     | 132,15              | 1,63            |
| CaCl <sub>2</sub>                     | 110,99              | 1,3             |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 147,03              | 1,7             |
| CaCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 219,09              | 2,5             |
| Lactat de Ca                          | 308,30              | 4,5             |
| Acid citric anhidru                   | 192,12              | 5,52            |
| Monohidrat                            | 120,14              |                 |
| Etanol                                | 46,07               | 1,29            |
| Glycol                                | 62,07               | 1,73            |
| Glicerină                             | 92,09               | 2,6             |
| Acid lactic                           | 90,08               | 2,3             |
| Clorură de magneziu anhidru           | 95,23               | 2,02            |
| Sulfat de magneziu anhidru            | 120,39              | 6,3             |
| Fenol                                 | 94,11               | 2,8             |

| Substanțe                                             | Greutate moleculară | Gramo %ml apă |
|-------------------------------------------------------|---------------------|---------------|
| <b>Fosfați</b>                                        |                     |               |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                              | 136,09              | 2,18          |
| $\text{K}_2\text{HPO}_4$                              | 174,18              | 2,8           |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                             | 120,01              | 2,1           |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$    | 138,01              | 2,45          |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ exicator                    | 141,98              | 1,75          |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  | 268,09              | 3,32          |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 358,17              | 4,45          |
| <b>Clorură de potasiu</b>                             | 74,55               | 1,19          |
| <b>Iodură de potasiu</b>                              | 166,02              | 2,59          |
| <b>Oxalat de potasiu</b>                              | 184,23              | 2,13          |
| <b>Monohidrat</b>                                     |                     |               |
| Propilen glicol                                       | 76,09               | 2,0           |
| Acetat de sodiu anhidru                               | 82,04               | 1,18          |
| Bicarbonat de sodiu                                   | 84,0                | 1,39          |
| Bicarbonat de sodiu anhidru                           | 106,00              | 1,32          |
| Carbonat de sodiu $2\text{H}_2\text{O}$               | 124,02              | 1,56          |
| Clorură de sodiu                                      | 58,46               | 0,9           |
| Citrat de sodiu                                       | 294,12              | 3,02          |
| Lactat de sodiu                                       | 112,07              | 1,72          |
| Propionat de sodiu                                    | 96,07               | 1,47          |
| Sulfat de sodiu $10 \text{H}_2\text{O}$               | 322,22              | 3,95          |
| Sulfat de sodiu                                       | 142,06              | 1,61          |
| <b>Zaharuri</b>                                       |                     |               |
| Fructoză                                              | 180,16              | 5,05          |
| Galactoză anhidră                                     | 180,16              | 4,92          |
| Glucoză anhidră (dextroză)                            | 180,16              | 5,05          |
| Glucoză monohidrat                                    | 198,2               | 5,51          |
| Lactoză                                               | 360,31              | 9,75          |
| Sucroză                                               | 342,30              | 9,25          |
| Uree                                                  | 60,06               | 1,6           |

### Prepararea soluțiilor acide aproximativ normale

Se cîntărește (g) sau se măsoară (ml) din soluțiile date în tabelul XLVII și se completează la 1 000 ml cu apă distilată.

Tabelul XLVII

| Acizi           | Formula                   | g     | ml    |
|-----------------|---------------------------|-------|-------|
| acid clorhidric | $\text{HCl}$              | 36,46 | 82,65 |
| acid azotic     | $\text{HNO}_3$            | 63,02 | 72,81 |
| acid acetic     | $\text{CH}_3\text{-COOH}$ | 60,03 | 81,70 |
| acid sulfuric   | $\text{H}_2\text{SO}_4$   | 49,04 | 27,85 |
| acid fosforic   | $\text{H}_3\text{PO}_4$   | 32,68 | 38,69 |



## INDICATORI

Un indicator este o substanță organică colorată cu caracter acid sau bazic foarte slab care își modifică culoarea în funcție de pH.

Utilizarea indicatorului constă în determinarea pH-ului soluțiilor.

Punctul la care își schimbă indicatorul culoarea se numește „punct de viraj“.

### INDICATORI DE pH

Indicatorii de pH sau acido-bazici sînt acele substanțe a căror culoare se schimbă în funcție de concentrația ionilor  $H^+$  sau  $OH^-$  respectiv de pH. Condițiile pe care trebuie să le îndeplinească un indicator de pH sînt următoarele:

1. — Schimbarea de culoare să fie reversibilă adică indicatorul să funcționeze reversibil.
2. — Schimbarea de culoare să se producă brusc deci într-un interval de pH cît mai mic.
3. — Indicatorul să fie solubil în apă pentru ca soluția să fie suficient de colorată.
4. — Indicatorul să aibă o putere de colorare, chiar pentru concentrații mici de indicator, culoarea trebuie să fie ușor observabilă.

Tabelul XLVIII

#### Indicatori simpli Indicatori Sørensen

| Numele indicatorului | Denumirea chimică                         | Domeniul de viraj | Variația de culoare    | g indicator % ml | Soluții    |
|----------------------|-------------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------|------------|
| Metiloranj           | Dimetil-amino-azobenzol sulfonat de sodiu | 3,1—4,4           | Roșu-galben-portocaliu | 0,1              | apă        |
| Roșu de metil        | Acid dimetil-amino-azobenzol-o-carbonic   | 4,4—6,2           | Roșu galben            | 0,2              | alcool 70% |
| Roșu neutru          | Clorură de dimetil-diamină-fenazină       | 6,8—8,0           | Roșu-galben            | 0,1              | alcool 70% |
| Lacmus (turnesol)    | —                                         | 5,0—8,0           | Roșu albastru          | 1                | apă        |
| Fenolftaleină        | —                                         | 8,2—10,0          | Incoloră-roșie         | 0,1              | alcool 70% |
| Timolftaleină        | —                                         | 9,3—10,5          | Incoloră albastru      | 0,1              | alcool 70% |

5. — Schimbarea de culoare să se producă la adaosul unor concentrații mici de acid sau de bază.

6. — Indicatorul trebuie să fie stabil în condițiile obișnuite de lucru: apă, lumină, oxigenul, bioxidul de carbon să nu îl altereze.

Indicatorii acido-bazici se pot împărți în mai multe clase și anume:

- de culoare
- de fluorescență
- de absorbție
- de turbidimetrie

Indicatorii acido-bazici sînt simpli, micști și universali. Indicatorii simpli se caracterizează printr-un interval mare de viraj.

O gamă largă de indicatori simpli cu modul de preparare și întrebuințare a acestora alcătuiesc tabelul XLVIII.

(continuare tabelul XLVIII)

Indicatori Clark și Lubs

| Numele indicatorului  | Denumirea chimică            | Domeniul de viraj | Variația de culoare      | Concentrația g coloranți % ml soluție alcoolică 96° | Cantitatea NaOH N/20 ml |
|-----------------------|------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|
| Albastru de timol     | Timolsulfoftaleină           | 1,2—2,8           | Roșu-galbenă             |                                                     |                         |
| Albastru de bromfenol | Tetrabromfenol-sulfoftaleină | 3,0—4,6           | Galbenă-albastru violetă | 0,04                                                | 3,0                     |
| Roșu de clorfenol     | Diclor-fenolsulfoftaleină    | 4,8—6,4           | Galbenă-roșu             | 0,04                                                | 4,7                     |
| Roșu de bromfenol     | Dibrom-fenol-sulfoftaleină   | 5,2—6,8           | Galbenă-roșu             | 0,04                                                | 3,9                     |
| Albastru de bromtimol | Dibrom-timol-sulfoftaleină   | 6,0—7,6           | Galbenă-albastru         | 0,04                                                | 3,2                     |
| Purpură de bromcrezol | Dibrom-crezol-sulfoftaleină  | 5,2—6,8           | Galbenă-purpură          | 0,02                                                | 3,7                     |
| Roșu de fenol         | Fenolsulfoftaleină           | 6,8—8,4           | Galbenă-roșu             | 0,02                                                | 5,6                     |
| Roșu de crezol        | Crezolsulfo-o-ftaleină       | 7,2—8,8           | Galbenă-roșu             | 0,02                                                | 5,3                     |
| Albastru de timol     | Tio-sulfoftaleină            | 9,0—10,6          | Galbenă-albastru         | 0,04                                                | 4,3                     |

În tabelul XLIX se dau o serie de indicatori micști (amestecuri de indicatori). Acești indicatori au proprietatea de a avea un „punct de viraj” și un „interval” așa cum au indicatorii simpli.

## Indicatori micști

| Compoziția soluției indicatorului                                                              | pH   | Schimbarea culorii |               | Observații                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| O parte galben dimetil (0,1% în alcool) la o parte albastru de metilen (10,1% în alcool)       | 3,25 | albastru-violet    | verde         | Lap H = 3,2 — albastru violet<br>La pH = 3,4 — verde                               |
| O parte metiloranj (0,1% în apă) la o parte indigocarmin (0,25% în apă)                        | 4,1  | violet             | verde         | Foarte potrivit pentru titrare la lumina artificială                               |
| Trei părți albastru bromcrezol (0,1% în alcool) la o parte roșu-metil (0,1% în alcool)         | 5,1  | roșu               | verde         | Schimbarea bruscă a culorii                                                        |
| O parte verde-bromcrezol (0,1% în apă, la o parte alizarin-sulfonat de sodiu) (0,1% în apă)    | 5,6  | violet             | galben verzui | la pH=5,6 — roșu-brun                                                              |
| O parte roșu-neutru (0,1% în alcool) la o parte albastru de metilen (0,1% în apă)              | 7,0  | violet-albastru    | verde         | La pH = 7 — albastru-violet. Se păstrează în sticle brune                          |
| O parte albastru bromtimol (0,1% în apă, la o parte roșu de fenol (0,1% în apă)                | 7,5  | galben             | violet        | La pH = 7,2 — verde murdar; la pH = 7,4 — slab violet; la pH = 7,6 — violet închis |
| O parte roșu-crezol (0,1% în apă) la trei părți albastru timol (0,1% în apă)                   | 8,3  | galben             | violet        | La pH = 8,2 — roz<br>La pH = 8,4 — violet clar                                     |
| O parte albastru timol (0,1% în apă) la trei părți fenolftaleină (0,1% în alcool 50%)          | 9,0  | galben             | violet        | la pH = 9,0 — verde                                                                |
| Două părți fenolftaleină (0,1% în alcool 50%) la o parte α-naftolftaleină (0,1% în alcool 50%) | 9,6  | slab-roz           | violet        | La pH = 9,6 — verde                                                                |
| O parte fenolftaleină (0,1% în alcool) la o parte timolftaleină (0,1% în alcool)               | 9,9  | incolor            | violet        | La pH = 9,6 — roz<br>La pH = 10,0 — violet                                         |
| Două părți timolftaleină (0,1% în alcool) la o parte galben de alizarină (0,1% în alcool)      | 10,2 | galben             | violet        | Viraj net                                                                          |
| Două părți albastru de Nil (0,2% în alcool) la o parte galben de anizarină (0,1% în alcool)    | 10,3 | verde              | roșu-brun     |                                                                                    |



Indicatorii universali sînt amestecuri de indicatori care au un interval de viraj în diferite domenii:

- indicatorul Amsden-Bogen
- indicatorul Guillaumin

1) *Indicatorul Amsden-Bogen* conține:

- fenoltaleină 100 mg
- roșu de metil 200 mg
- dimetil-amino-azo-benzen 300 mg
- albastru de bromtimol 400 mg
- albastru de timol 500 mg
- alcool etilic 95° 500 ml
- NaOH 0,1 N pînă la apariția culorii galbene.

Substanțele din soluția indicatoare sînt triturate în mojar și reluate cu alcool etilic.

Zonele de indicație a pH-ului cu indicatorul Amsden-Bogen sînt cuprinse în tabelul L.

Tabelul L

| pH   | Culoarea   |
|------|------------|
| 2,0  | roz        |
| 4,0  | roșu-oranj |
| 6,0  | galben     |
| 8,0  | verde      |
| 10,0 | albastru   |

2) *Indicatorul Guillaumin* conține:

- roșu de metil 125 mg
- albastru de bromtimol 400 mg
- NaOH 0,1 N 0,5 ml
- apă distilată 1 000 ml

Substanțele sînt triturate în mojar și reluate în balon cotat la 1000 ml apă.

Zonele de indicație ale pH-ului cu indicatorul Guillaumin sînt prezentate în tabelul LI.

Tabelul LI

| pH  | Culcare        |
|-----|----------------|
| 4,0 | roșu           |
| 5,0 | portocaliu     |
| 6,0 | galben         |
| 7,0 | verde          |
| 8,0 | verde-albastru |
| 9,0 | albastru       |

## MODUL DE LUCRU CU INDICATORI UNIVERSALI

La 1 ml soluție de cercetat se adaugă o picătură din indicatorul necesar. În funcție de culoarea obținută se stabilește zona de pH.

### PRACTICA DETERMINĂRII COLCRIMETRICE A pH-ului

Determinarea colorimetrică a pH-ului necesită două etape de lucru și anume:

1. — *etapa orientativă*; în care sînt folosite hîrțile și soluțiile indicatoare cu zonă de viraj extinsă (cazul indicatorilor acido-bazici). Altit în cazul hirtiei indicator cit și în cazul soluțiilor indicatoare culoarea obținută prin contactul indicatorilor cu proba de cercetat este apreciată după schimbarea culorii conform tabelelor sau comparată cu o scară etalon colorată care indică pH-ul corespunzător.

Hîrțile indicatoare sînt:

— hîrtia de turnesol care indică doar aciditatea sau alcalinitatea unei soluții;

— hîrtia indicator cu macrodiviziuni avînd scara de pH între 1 și 14 și cu diviziuni de o unitate.

*Modul de lucru*: hîrțile indicatoare sînt hîrtii de filtru mai groase impregnate cu indicator care se umectează cu lichidul de cercetat. După 15—30 secunde culoarea hirtiei modificată este comparată cu o scară etalon colorată (există pe ambalaj) care indică pH-ul corespunzător.

2) *Etapă cu aproximație* de 0,1 u în care se folosește sistemul hîrtilor și al soluțiilor indicatoare:

a) hîrțile indicatoare cu microdiviziuni au scara pH-ului de la 1 la 14;

b) soluțiile indicatoare sînt soluții standard de indicatori în soluții standard, de tampon. Soluțiile indicatoare cele mai folosite în determinarea pH-ului (urină, medii) sînt derivații nitrici ai fenolului (metoda Michaelis) cu scara pH-ului de la 2,8—8,4.

Tabelul LII

Soluțiile standard de indicatori (Michaelis)

| Indicatorul            | Zona de pH | Concentrația soluției |
|------------------------|------------|-----------------------|
| $\alpha$ -dinitrofenol | 2,8—4,4    | 0,050 g % ml          |
| $\gamma$ -dinitrofenol | 4,0—5,4    | 0,025 g % ml          |
| p-dinitrofenol         | 5,4—7,0    | 0,1 g % ml            |
| m-dinitrofenol         | 6,8—8,4    | 0,3 g % ml            |

Din aceste soluții stoc se fac diluții cu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 N ce corespund pH-urilor indicate în tabelul LIII. Etaloanele se prepară în modul următor: se aleg eprubete din sticlă incoloră, cu diametre egale. În fiecare eprubetă se introduce o soluție de 1/10 din soluția stoc, conform tabelului și se completează

la volumul de 7 ml cu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 N (5,30 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidru se dizolvă în 1 000 ml apă distilată).

Eprubetele se închid la flacără, se notează pe fiecare pH-ul corespunzător și se așază într-un stativ special (tabelul LIII).

Tabelul LIII

Prepararea etaloanelor de comparație

Seria I

Seria II

| Numărul eprubetei | pH  | Soluție diluată 1/10 de $\alpha$ -dinitrofenol | Soluție N/10 de $\text{CO}_2\text{Na}_2$ | pH  | Soluție diluată 1/10 de $\alpha$ -dinitrofenol | Soluție N/10 de $\text{CO}_2\text{Na}_2$ |
|-------------------|-----|------------------------------------------------|------------------------------------------|-----|------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1                 | 2,8 | 0,51                                           | 6,49                                     | 4,0 | 0,74                                           | 6,26                                     |
| 2                 | 3,0 | 0,78                                           | 6,22                                     | 4,2 | 1,10                                           | 5,90                                     |
| 3                 | 3,2 | 1,20                                           | 5,80                                     | 4,4 | 1,65                                           | 5,35                                     |
| 4                 | 3,4 | 1,74                                           | 5,26                                     | 4,6 | 2,40                                           | 4,60                                     |
| 5                 | 3,6 | 2,50                                           | 4,50                                     | 4,8 | 3,40                                           | 3,60                                     |
| 6                 | 3,8 | 3,40                                           | 3,60                                     | 5,0 | 4,50                                           | 2,50                                     |
| 7                 | 4,0 | 4,60                                           | 2,40                                     | 5,2 | 5,50                                           | 1,50                                     |
| 8                 | 4,2 | 5,70                                           | 1,30                                     | 5,4 | 6,60                                           | 0,40                                     |
| 9                 | 4,4 | 6,70                                           | 0,30                                     | —   | —                                              | —                                        |

Seria III

Seria IV

| Numărul eprubetei | pH  | Soluție diluată 1/10 de p-nitrofenol | Soluție N/10 de $\text{CO}_2\text{Na}_2$ | pH  | Soluție diluată 1/10 de m-nitrofenol | Soluție N/10 de $\text{CO}_2\text{Na}_2$ |
|-------------------|-----|--------------------------------------|------------------------------------------|-----|--------------------------------------|------------------------------------------|
| 1                 | 5,4 | 0,16                                 | 6,84                                     | 6,8 | 0,27                                 | 6,73                                     |
| 2                 | 5,6 | 0,25                                 | 6,75                                     | 7,0 | 0,43                                 | 6,57                                     |
| 3                 | 5,8 | 0,40                                 | 6,6                                      | 7,2 | 0,66                                 | 6,34                                     |
| 4                 | 6,0 | 0,63                                 | 6,37                                     | 7,4 | 1,0                                  | 6,0                                      |
| 5                 | 6,2 | 0,94                                 | 6,06                                     | 7,6 | 1,50                                 | 5,50                                     |
| 6                 | 6,4 | 1,40                                 | 5,60                                     | 7,8 | 2,3                                  | 4,70                                     |
| 7                 | 6,6 | 2,08                                 | 4,92                                     | 8,0 | 3,0                                  | 4,0                                      |
| 8                 | 6,8 | 3,0                                  | 4,0                                      | 8,2 | 4,2                                  | 2,8                                      |
| 9                 | 7,0 | 4,05                                 | 2,95                                     | 8,4 | 5,2                                  | 1,80                                     |

METODA MICHAELIS

Principiul metodei se bazează pe compararea culorii soluției de cercetat în care s-a introdus un indicator cu o serie de etaloane colorate.

Indicatorul își schimbă intensitatea culorii odată cu variația de pH a probei de determinat.

**Materiale necesare:** — un bloc comparator din lemn  $8,5 \times 9 \times 4,5$  cm prevăzut cu un filtru de sticlă albastră pentru a ușura aprecierea intensităților diferite de culoare și o sticlă mată care difuzează lumina primită de la sursă (fereastră). Blocul comparator este prevăzut de asemenea cu 4—6 orificii în sens vertical în care se introduc etaloanele și proba (fig. 3);

— un stativ cu indicatorii standard din seria nitrofenolilor.



### Modul de lucru:

Se aleg 4 eprubete cu același diametru interior și aceeași culoare cu eprubetele de etalonare, care sînt așezate conform schemei de mai jos și conțin:

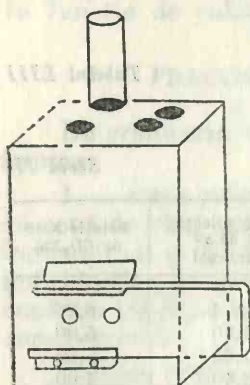


Fig. 3. — Blocul comparator.

|                                                                         |                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <i>Eprubeta I</i><br>6 ml soluție de cercetat<br>1 ml soluție indicator | <i>Eprubeta III</i><br>Indicator standard                            |
| <i>Eprubeta II</i><br>7 ml apă distilată                                | <i>Eprubeta IV</i><br>6 ml soluție de cercetat<br>1 ml apă distilată |

Se schimbă tubul cu indicatorul standard plasat în orificiul 3 pînă cînd privind prin cele 2 orificii ale comparatorului, observăm că cele două seturi de eprubete așezate față în față au aceeași culoare.

# CAPITOLUL III

## METODE FIZICOCHEMICE

### METODE OPTICE

Din această categorie fac parte următoarele metode:

I. Metode refractometrice:

II. Metode fotometrice (colorimetrie, spectrofotometrie în spectrul vizibil turbidimetrie, spectrofotometrie U.V. și spectroscopia de absorbție atomică).

III. Metode bazate pe fluorescența probelor biologice (microscopia în fluorescență și fluorometrie).

#### I. METODE REFRACTOMETRICE

Refractometria se bazează pe variația indicelui de refracție al unei soluții în funcție de concentrația substanței dizolvate. Indicele de refracție „n” este o constantă fizică, caracteristică pentru o substanță dată, depinzând de cantitatea, mărimea și structura particulelor dizolvate. Principala aplicație a refractometriei în laboratorul clinic se bazează pe observația lui Reiss, după care indicele de refracție al serului depinde de concentrația sa în proteine.

Determinarea indicelui de refracție se face cu ajutorul refractometrului de diferite tipuri. Determinând indicele de refracție și utilizând tabelul LIV (tabelul Reiss) se poate calcula direct și rapid concentrația proteinelor serice, ținând seama de temperatura la care se face determinarea (tabelul LIV).

Valorile obținute sînt orientative, prezentînd un mare grad de aproximație, pentru valori precise recomandîndu-se utilizarea metodelor chimice. Metoda refractometrică se poate aplica atît exsudatelor cit și transsudatelor.

Tabelul „Reiss“

| n 17°,5 | Concentrația proteinelor serice (g <sup>0</sup> /oo) | Concentrația proteinelor din exsudate sau transsudate (g <sup>0</sup> /oo) | n 17°,5 | Concentrația proteinelor serice (g <sup>0</sup> /oo) | Concentrația proteinelor din exsudate sau transsudate (g <sup>0</sup> /oo) |
|---------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 1,33705 | 6,3                                                  | 7,7                                                                        | 1,34575 | 56,8                                                 | 55                                                                         |
| 1,33743 | 8,6                                                  | 9,7                                                                        | 1,34612 | 59                                                   | 57                                                                         |
| 1,33781 | 10,8                                                 | 11,8                                                                       | 1,34650 | 61,2                                                 | 59                                                                         |
| 1,33820 | 13                                                   | 13                                                                         | 1,34687 | 63,4                                                 | 61,1                                                                       |
| 1,33858 | 15,2                                                 | 15,9                                                                       | 1,34724 | 65,5                                                 | 63,1                                                                       |
| 1,33896 | 17,4                                                 | 17                                                                         | 1,34761 | 67,7                                                 | 65,1                                                                       |
| 1,33934 | 19,6                                                 | 20,1                                                                       | 1,34798 | 69,8                                                 | 67,1                                                                       |
| 1,33972 | 21,8                                                 | 22,1                                                                       | 1,34836 | 72                                                   | 69,1                                                                       |
| 1,34010 | 24                                                   | 24,2                                                                       | 1,34873 | 74,2                                                 | 71,2                                                                       |
| 1,34048 | 26,2                                                 | 26,2                                                                       | 1,34910 | 76,9                                                 | 73,2                                                                       |
| 1,34086 | 28,4                                                 | 28,3                                                                       | 1,34947 | 78,5                                                 | 75,2                                                                       |
| 1,34124 | 30,6                                                 | 30,4                                                                       | 1,34984 | 80,6                                                 | 77,2                                                                       |
| 1,34162 | 32,8                                                 | 32,4                                                                       | 1,35021 | 82,8                                                 | 79,2                                                                       |
| 1,34199 | 35                                                   | 34,5                                                                       | 1,35058 | 84,9                                                 | 81,2                                                                       |
| 1,34237 | 37,2                                                 | 36,5                                                                       | 1,35095 | 87,1                                                 | 83,2                                                                       |
| 1,34275 | 39,4                                                 | 38,6                                                                       | 1,35132 | 89,2                                                 | 85,2                                                                       |
| 1,34313 | 41,6                                                 | 40,7                                                                       | 1,35169 | 91,4                                                 | 87,2                                                                       |
| 1,34350 | 43,8                                                 | 42,7                                                                       | 1,35205 | 93,5                                                 | 89,2                                                                       |
| 1,34388 | 46                                                   | 44,8                                                                       | 1,35242 | 95,7                                                 | 91,2                                                                       |
| 1,34426 | 48,1                                                 | 46,8                                                                       | 1,35279 | 97,8                                                 | 93,2                                                                       |
| 1,34463 | 50,3                                                 | 48,9                                                                       | 1,35316 |                                                      | 95,2                                                                       |
| 1,34500 | 52,5                                                 | 51                                                                         | 1,35352 | 102                                                  | 97,2                                                                       |
| 1,34537 | 54,7                                                 | 53                                                                         | 1,35388 | 104,1                                                | 99,1                                                                       |

## II. METODE FOTOMETRICE

Fotometria se bazează pe excitarea luminoasă a electronilor sau a moleculelor substanței.

În general, intensitatea luminii emisă de o sursă luminoasă variază cu  $\lambda$  (lungimea de undă), iar imaginea (curba) acestei variații se numește spectru. După lungimea de undă ( $\lambda$ ) exprimată în nanometri (1 nm = 1  $\mu$  =  $10^{-9}$  m) sau în Ångströmi (Å) (1 Å =  $10^{-10}$  m = 10 nm) spectrul undelor electromagnetice folosite în fotometrie se împarte în 3 regiuni:

- ultraviolet                      200—450 nm, 2000—4000 Å
  - vizibil                            400—800 nm, 4000—8000 Å
  - infraroșu                        800—20 000 nm, 8000—200 000 Å
- 1 Å = 0,1  $\mu$

Culorile în spectrul vizibil sint date în tabelul LV



## Culorile din spectrul vizibil

| Lungimea de undă în nm | Culoarea       | Culoarea complementară |
|------------------------|----------------|------------------------|
| 400—450                | violet         | galben-verde           |
| 450—480                | albastru       | galben                 |
| 480—490                | verde-albastru | portocaliu             |
| 490—500                | albastru-verde | roșu                   |
| 500—560                | verde          | roșu-purpur            |
| 560—570                | galben-verde   | violet                 |
| 570—590                | galben         | albastru               |
| 590—625                | portocaliu     | verde-albastru         |
| 625—750                | roșu           | albastru-verde         |

Pentru excitarea electronilor sînt necesare energii mari, și cum energia este invers proporțională cu lungimea de undă, acest fenomen se produce în regiunile ultraviolett și vizibil ale spectrului. În infraroșu, energia fiind mai mică, are loc o excitare a moleculelor (se modifică energia de vibrație și de rotație moleculară).

Energia fiind cuantificată, moleculele substanțelor cercetate vor absorbi anumite cantități de energie pentru a trece în stare excitată. Aceasta explică dependența absorbției luminii de către o substanță de lungime de undă. Pentru o anumită lungime de undă, caracteristică substanței cercetate, există o relație direct proporțională între cantitatea de lumină și concentrația substanței respective, exprimată de legea Beer-Lambert.

Notînd cu  $I_0$  intensitatea luminii incidente, și cu  $I$  intensitatea luminii transmise după străbaterea drumului optic  $d$ , avem relația:

$$I = I_0 \cdot 10^{-k \cdot c \cdot d}$$

unde:

$c$  = concentrația substanței absorbante

$k$  = extincția specifică

Transmisia „ $T$ ” se definește ca  $T = \frac{I}{I_0}$ , iar extincția „ $E$ ” (densitatea optică sau absorbția) se definește ca:

$$E = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot c \cdot d$$

Exprimînd concentrația în molarități, în loc de grame la litru, în locul extincției specifice  $k$  apare coeficientul de extincție molară —  $\Sigma$ , întîlnit în mod obișnuit în formula absorbantei.

În general se cunosc lungimea drumului optic (grosimea cuvei) și coeficientul de extincție molară  $\Sigma$ , caracteristice substanței, așa încît din determinarea extincției se poate calcula direct concentrația.

Cînd  $\Sigma$  nu este cunoscut, se folosește valoarea  $E_1^{1\%}$  cm (găsită curent în literatură) care reprezintă valoarea extincției la o anumită lungime de undă

pentru o cuvă cu grosimea de 1 cm și concentrația substanței adsorbante de 1%. Folosind această valoare se calculează concentrația din relația:

$$E\% \text{ cm} = A/c \quad 1 \text{ unde:}$$

$A$  = absorbanta (extincția) determinată experimental;

$l$  = grosimea cuvei cu care se lucrează;

$c$  = concentrația care urmează a fi calculată.

Având în vedere faptul că absorbția luminii de către o substanță se produce la anumite lungimi de undă, aparatele folosite sînt prevăzute cu seturi de filtre (care limitează anumite domenii de lungimi de undă) sau cu monocromatoare (sisteme de fante care selecționează o singură lungime de undă). Se impune deci utilizarea filtrului potrivit în cazul fotocolorimetrelor sau stabilirea lungimii de undă pe tamburul lungimilor de undă în cazul spekolului.

\*

Fotometria utilizată în laboratorul clinic folosește cu predilecție regiunea vizibilă a spectrului, analizînd compuși colorați.

Metodele colorimetrice se împart convențional în:

a) metode colorimetrice vizuale în care diferențele de intensitate a culorii sînt apreciate cu ochiul liber, folosind comparatoarele și colorimetrele.

Cel mai cunoscut tip de colorimetru — Duboscque — este prevăzut cu o prismă care face ca cele 2 raze care trec prin proba standard și proba de cercetat să ilumineze fiecare cîte o jumătate a imaginii.

Se variază lungimea stratului din proba de cercetat pînă la egalizarea culorilor. În acest moment raportul concentrațiilor celor două substanțe este invers proporțional cu raportul lungimilor straturilor:

$$\frac{C_x}{C_s} = \frac{l_s}{l_x} \quad \text{de unde } C_x = \frac{l_s}{l_x} \cdot C_s$$

— unde  $l_s$  și  $l_x$  se măsoară, iar  $C_s$  reprezintă concentrația probei standard.

b) Metode electrocolorimetrice sau spectrofotometrice în care diferența de intensitate între lumina transmisă de probă și cea transmisă de maror este transformată în energie electrică cu ajutorul unei fotocelule, amplificată și înregistrată. Citirile se fac direct în absorbante sau transmitanțe. Fotocolorimetrul este prevăzut cu seturi de filtre, iar spekolul — un aparat mai perfecționat — posedă un monocromator. Modul de lucru este descris în prospectul fiecărui aparat.

Concentrația substanței colorate se determină fie prin comparare cu o soluție etalon, fie prin interpolarea pe o curbă etalon. Curbă etalon se realizează cu ajutorul mai multor diluții (efectuate exact) ale soluției etalon, soluție obținută prin dizolvarea unei substanțe de mare puritate în balon cotat.

Din soluția etalon se fac cel puțin 5 diluții, la care se adaugă reactivii necesari pentru obținerea reacției colorate. Se citesc extincțiile la lungimea de undă adecvată, față de un blanc efectuat exact în aceleași condiții, dar folosind apă distilată în locul probei.

Pentru trasarea curbei se utilizează de preferat hîrtia milimetrică. Pe abscisă se notează concentrația corespunzătoare a diluțiilor în mg/ml, iar pe ordonată extincțiile citite la aparat. Reprezentarea grafică a extincțiilor în



funcție de concentrația substanței aflată în probele respective trebuie să fie o dreaptă. Concentrația probei de determinat se află prin interpolarea extincției citite pe dreapta etalon.

Dacă reprezentarea grafică a relației dintre extincție și concentrație nu este o dreaptă care trece prin origine, concentrația probei de determinat se află prin interpolarea extincției citite pe curba etalon, fără a se mai folosi factorul discutat.

Determinarea concentrației soluțiilor de cercetat se poate simplifica folosindu-se factorul (F) care se definește ca raportul dintre concentrație și extincție:

$$F = \frac{C}{E}. \text{ Deci } C = F \cdot E$$

C = concentrația. F = factorul. E = extincția.

Teoretic, F trebuie să fie același pentru toate concentrațiile. Practic datorită factorilor subiectivi există variații. De aceea este recomandabil să se utilizeze media rezultată din valorile factorilor obținuți pentru fiecare concentrație a soluției etalon înălăturându-se valorile aberante:

$$F = \frac{\sum_1^n (F_1 - n)}{n} \quad \text{unde:}$$

n = numărul de factori

c) Metode turbidimetrice, care permit determinarea opalescenței unei soluții prin comparație cu opalescența unei soluții de concentrație cunoscută. Aparatele folosite sînt nefelometre speciale, colorimetre sau chiar fotometrul Pulfrich. Ca și în colorimetrie, se aplică legea Beer Lambert. Grosimile straturilor opalescente sînt invers proporționale cu concentrațiile lor.

La fotometrul tip I.O.R. se poate monta și un dispozitiv de nefelometrie, în acest caz lucrîndu-se cu filtrele L ale căror caracteristici sînt prezentate în tabelul LVI.

d) Spectrofotometria în UV folosește aceleași principii ca cea în vizibil; are avantajul de a putea utiliza probele direct, fără reacții de colorare, dar necesită o aparatură specială prevăzută cu lămpi care emit radiații în UV. Modul de lucru este descris în prospectul fiecărui aparat.

Tabelul LVI

| Denumirea filtrului | Maximum de transparență în Å | Transparența maximă în T% |
|---------------------|------------------------------|---------------------------|
| L <sub>1</sub>      | 6 200                        | 85                        |
| L <sub>2</sub>      | 5 200                        | 65                        |
| L <sub>3</sub>      | 4 500                        | 12                        |

c) Spectroscopia de absorbție atomică, numită și fotometrie cu flacără se bazează pe înregistrarea spectrelor de absorbție ale metalelor alcaline sau alcalino-pămîntoase supuse excitației prin căldură în flacără neluminoasă de gaz. Este o metodă cantitativă, de înaltă precizie care permite determinarea la niveluri foarte joase a concentrației elementelor respective în soluții.



### III. METODE BAZATE PE FLUORESCENȚĂ

Metodele de fluorescență au la bază proprietățile fluorescente ale unor substanțe. În mod obișnuit, în urma excitării luminoase a electronilor, revenirea la starea fundamentală se face prin emiterea energiei acumulate sub formă de energie calorică. Unele substanțe însă pierd o parte a energiei absorbite, remit luminos o radiație cu energie mai mică, deci cu lungime de undă mai mare care reprezintă spectrul caracteristic substanței emițătoare. În general radiațiile excitatoare sînt în U.V. iar cele fluorescente în vizibil.

Atunci cînd atît radiația excitatoare cît și radiația fluorescentă sînt în spectrul vizibil se poate folosi spekolul. Măsurarea se face perpendicular pe fasciculul incident, măsurîndu-se radiația secundară pentru a evita perturbarea de către radiația primară.

Substanțele fluorescente atașate moleculelor biologice servesc ca indicatori pentru schimbările conformaționale.

### METODE ELECTRICE

Din această categorie fac parte următoarele metode:

- a) pH-metria
- b) electroforeza
- c) imunoelectroforeza.

#### pH-METRIA

Soluțiile obținute din electroliți (substanțe care prin dizolvare se disociază) conțin ioni  $H^+$  proveniți fie din disocierea substanțelor dizolvate în apă, fie în mică măsură din disocierea moleculelor de apă. Disocierea nu este niciodată completă, depinde de raportul concentrației ionilor disociați și nedisociați, raport denumit „constantă de disociere”.

În funcție de mărimea acestei constante acizii și bazele se pot împărți în: — *acizi și baze tari* cu constantă de disociere mare ( $HCl$ ,  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$ ) ( $NaOH$ ,  $KOH$  etc.);

— *acizi și baze slabe* cu constantă de disociere mică: ( $CO_3H_2$ ) ( $NH_4OH$  etc.).

O soluție acidă sau bazică conține întotdeauna ioni  $H^+$  și ioni  $OH^-$ .

Dacă soluția conține în cantitate mai mare ioni  $H^+$  față de ionii de  $OH^-$ , soluția este acidă, în caz invers este alcalină. Caracterul de acid sau bază este determinat de concentrația ionilor  $H^+$  sau  $OH^-$ .

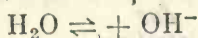
Pentru a exprima mai ușor concentrația în ioni  $H^+$  și mai ales variațiile acestei concentrații s-a introdus noțiunea de exponent de hidrogen sau indice de hidrogen ce a fost notat „pH”.

pH-ul este logaritmul zecimal cu semn schimbat al concentrației ionilor de hidrogen.

$$pH = -\log(H^+) \text{ sau}$$

$$(H^+) = 10^{-pH}$$

Prin disocierea apei se obțin ioni  $H^+$  și  $OH^-$



S-a determinat experimental că produsul ionic al apei este egal cu  $10^{-14}$ , adică  $(H^+) \cdot (OH^-) = 10^{-14}$

Cum la neutralitate nr. ionilor ( $H^+$ ) este egal cu nr. ionilor ( $OH^-$ ) înseamnă că:  
 $(H^+) = (OH^-) = 10^{-7}$ , adică  $pH = 7$  la neutralitate pentru soluții neutre.

$pH > 7$  pentru soluții bazice

$< 7$  pentru soluții acide

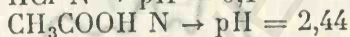
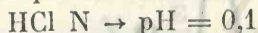
$pH$ -ul măsoară deci concentrația ionilor  $H^+$  sau  $OH^-$  și nu aciditatea unei soluții.

Trebuie făcută o deosebire între noțiunea de aciditate potențială și aciditate reală.

Aciditatea potențială sau totală exprimă numărul total de  $H^+$  dintr-o soluție fie liberă fie combinată cu anioni sub formă de molecule nedisociate.

Aciditatea reală exprimă cantitatea de ioni de hidrogen liberi prin care se manifestă în realitate acizii din soluție.

În felul acesta 2 acizi ( $HCl$  și  $CH_3COOH$ ) de aceeași normalitate cu aceeași aciditate totală, determinată prin titrare au cu totul altă aciditate ionică, fiind diferit disociați, deci au un  $pH$  cu totul deosebit.



#### MĂSURAREA pH-ULUI

Pentru determinarea acidității reale, deci pentru măsurarea  $pH$ -ului se pot folosi două metode: metoda electrometrică și metoda colorimetrică.

Prima metodă este precisă și necesită folosirea aparatului numit  $pH$ -metru.  $pH$ -metrele electronice sînt aparate ce permit determinarea directă a  $pH$ -ului citit pe un cadran cu ajutorul electrodului de sticlă avînd ca referință electrodul de calomel. Corecția aparatului se face cu ajutorul unei soluții tampon cu  $pH$  cunoscut. Modul de lucru este descris în prospectul fiecărui aparat.

Metoda colorimetrică se bazează pe proprietatea unor substanțe organice numite indicatori care în funcție de  $pH$ -ul soluției în care sînt dizolvate se disociază sau nu. Forma disociată are o culoare iar cea nedisociată o altă culoare. Acești indicatori sînt soluții apoase sau alcoolice ca atare sau impregnate pe hîrtie de filtru. Modul de preparare și întrebuințare a acestora este prevăzut la capitolul „Soluții”.

*Valorile normale ale  $pH$ -ului diferitelor lichide biologice:* sînge (măsurat în ser) = 7,30—7,45 (trebuie evitat orice contact cu aerul, altfel valorile falsificîndu-se și urcîndu-se între 7,35 și 7,65);

*lichidul cefalorahidian* = 7,52—7,85;

*saliva* = 6,50—6,80 (fără contact cu aerul)

6,80—7,20 (după contactul cu aerul)

*sucul gastric* = 1,5—1,8 (la adult, după prînz de probă), în jur de 5 la sugar;

*sucul pancreatic* = 7,5—8,5;

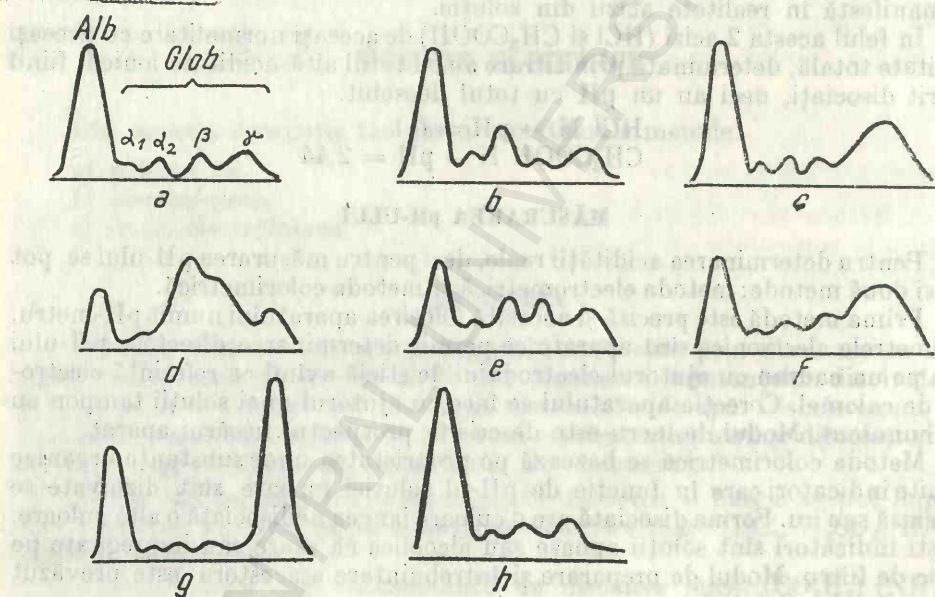
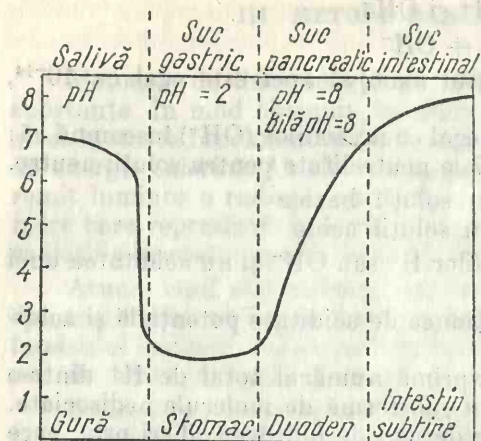
*sucul intestinal* = 7,5—8,5;

*bila* = în jur de 8;

*urina* = 6.

În figura 4, pentru exemplificare, este dată variația  $pH$ -ului de-a lungul tractului digestiv.

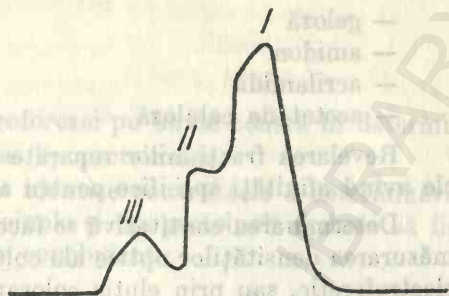




| Diagnostic                | g%              | Procentual |            |                   |                   |      |      |
|---------------------------|-----------------|------------|------------|-------------------|-------------------|------|------|
|                           | Proteine totale | Albu-mină  | Globu-line | alfa <sub>1</sub> | alfa <sub>2</sub> | bota | gama |
| a. normal                 | 7,5             | 53         | 47         | 6                 | 9                 | 12   | 20   |
| b. inflamație acută       | 7,5             | 49         | 51         | 5                 | 17                | 10   | 19   |
| c. inflamație cronică     | 8,2             | 45         | 55         | 4                 | 9                 | 11   | 31   |
| d. sindrom nefrotic       | 4,5             | 20         | 80         | 3                 | 40                | 19   | 18   |
| e. enteropatie exsudativă | 4,6             | 35         | 65         | 10                | 14                | 16   | 25   |
| f. ciroză hepatică        | 5,2             | 33         | 67         | 4                 | 6                 | 15   | 42   |
| g. mielom multiplu        | 10,3            | 27         | 73         | 4                 | 8                 | 9    | 52   |
| h. hipogamaglobulinemie   | 7,1             | 59         | 41         | 6                 | 12                | 18   | 5    |



c) Lipidograma. I —  $\beta$ -lipoproteină; II — pre- $\beta$ -lipoproteină; III —  $\alpha$ -lipoproteină.



## ELECTROFOREZA

Electroforeza reprezintă fenomenul de migrare a ionilor ( $A^+$  și  $B^-$ ) dintr-o soluție sub acțiunea cimpului electric conform legii lui Coulomb. Cationii  $A^+$  se vor deplasa spre polul negativ (catod) și anionii  $B^-$  se vor deplasa spre polul pozitiv (anod). Viteza de deplasare a unui ion în cimpul electric este direct proporțională cu sarcina electrică ( $E$ ) și invers proporțională cu pătratul distanței față de polii sursei de curent ( $D$ ).

$$V = \frac{E}{D^2}$$

Fracționarea electroforetică necesită:

1) o sursă de curent continuu și constant (redresor de curent continuu);

2) mediu sau suport de migrare, cu următoarele caracteristici:

— stabilitatea chimică

— neutralitate

— absența adsorbției și electroendosmozei

— inerție

— stabilitate la variații de pH și temperatură

— insolubilitatea în anumiți solvenți.

3) soluții tampon care să permită probei (proteine, glicoproteine, lipido-proteine) menținerea în limitele unui pH bine determinat.

Caracteristicile unui tampon pentru electroforeză sînt: pH și forța ionică.

Forța ionică exprimă concentrația efectivă a ionilor dintr-o soluție

În general, forța ionică trebuie să fie cuprinsă între 0,1 și 0,2;

valori  $< 0,1$  duc la întinderea fracțiunilor

valori  $> 0,2$  duc la nesepararea fracțiunilor.

În cazul pH-ului de 8,5 toate proteinele se comportă ca anioni și diferența lor de mobilitate este cea mai corespunzătoare pentru separarea fracțiunilor.

În funcție de sistemul de migrare există două tipuri de electroforeză:

— electroforeza liberă — migrare în fază lichidă;

— electroforeză de zonă — migrare în fază solidă.

Electroforeza de zonă este tipul cel mai folosit în laborator, efectuîndu-se pe următoarele mediu suport:

— hîrtie de filtru Whatman

- geloză
- amidon
- acrilamidă
- acetat de celuloză

Revelarea fracțiunilor separate prin electroforeză se face prin colorare, ele având afinități specifice pentru anumiți coloranți.

Determinarea cantitativă se face prin fotometrare directă, care constă în măsurarea densităților optice ale colorantului fixat pe fracțiunile desfășurate electroforetic, sau prin eluția colorantului din fiecare fracțiune și măsurarea densităților optice.

Absorbția colorantului și deci implicit intensitatea spotului obținut este direct proporțională cu concentrația fracțiunilor respective.

## PRACTICA ELECTROFOREZEI

Efectuarea electroforezei de zonă necesită un aparat alcătuit dintr-un redresor și o cameră de electroforeză.

*Redresorul* este alimentat de curent electric și este prevăzut cu dispozitive de reglare, voltmetru și ampermetru. El furnizează curent continuu reglabil la tensiunea dorită și are instrucțiuni proprii de funcționare.

*Camera de electroforeză* este construită din material plastic și conține 2 bacuri laterale care comunică între ele printr-o punte sau sifon. Bacurile sînt prevăzute cu șicane montate într-un sistem de labirint pentru a reduce difuzia produselor de electroliză formate în timpul funcționării. Fiecare bac conține electrod confecționat din platină, nichel sau cărbune. În cazul electrozilor de cărbune se impune separarea lor de banda de hîrtie prin membrane poroase sau saci de celofan. Electrozii de platină sînt cei mai folosiți fiind și cei mai rezistenți. Ei sînt montați în diagonală în cele două bacuri și sînt conectați la două fișe, legătura cu redresorul efectuîndu-se prin cablu electric. Camera de electroforeză este acoperită etanș cu un capac de sticlă sau material plastic. Dimensiunile bacurilor și forma camerei diferă după necesitate și după firma care le livrează.

Aparatul tip I.T.M. este folosit în mod curent în laboratoarele clinice din țara noastră. Modul de întrebuințare este descris în prospectul fiecărui aparat.

## ELECTROFOREZA PE HÎRTIE

Efectuarea acestei metode necesită un aparat de electroforeză alcătuit dintr-un redresor și o cameră de electroforeză.

Materialul și reactivii necesari:

1. Hîrtie de filtru specială (Whatman nr. 1, 4, 100, Schleicher Schüll nr. 2043 B, 2024).
2. Soluții tampon



3. Soluții de coloranți

4. Soluții de viraj

5. Soluții de eluare.

În laboratorul clinic aplicația electroforezei pe hîrtie constă în determinarea proteinelor, glicoproteinelor și a lipoproteinelor.

Pînă la faza de colorare etapele sînt identice pentru cele 3 determinări. Cantitățile pe care se lucrează glicoproteinele și lipoproteinele trebuie să fie mai mari pentru obținerea rezultatelor concludente.

## ELECTROFOREZA PROTEINELOR PE HÎRTIE

### Material și reactivi:

1. Aparat de electroforeză

2. Hîrtie de filtru specială pentru electroforeză

3. Tampon veronal pH = 8,6 forță ionică 0,1 (soluția de bază)

Na dietilbarbituric medinal, veronal sodic) ..... 20 g

Acid dietilbarbituric (veronal acid) ..... 3 g

Merthiolat de sodiu ..... 0,2 g

Apă distilată ..... 1 000 ml.

În momentul întrebuițării soluția de bază se diluează cu apă distilată pentru a obține următoarele soluții tampon:

— tampon veronal pH = 8,6 f.i. 0,075

3 vol. soluție de bază + 1 vol. apă distilată

— tampon veronal pH = 8,6 f.i. 0,05

1 vol. soluție de bază + 1 vol. apă distilată

— tampon veronal pH = 8,6 f.i. 0,035

1 vol. soluție de bază + 2 vol. apă distilată

— tampon veronal pH = 8,6 f.i. 0,025

1 vol. soluție de bază + 3 vol. apă distilată

4. Soluții de coloranți:

a) albastru de bromfenol 0,1 g sau: albastru bromfenol 1 g  
sulfat zinc 50 g

acid acetic glacial 50 ml

apă distilată pînă la 1 000 ml

b) azocarmin B 1 g

acid acetic glacial 28,2 ml

acetat de sodiu 3,69 g

glicerină 100 ml

apă distilată pînă la 1 000 ml



|                            |          |
|----------------------------|----------|
| c) amidoschwartz 10 B      | 1 g      |
| alcool metilic             | 900 ml   |
| acid acetic glacial        | 100 ml   |
| d) naftalen negru 12 B 200 | 1 g      |
| acid acetic 10%            | 1 000 ml |
| e) verde Geigy             | 1 g      |
| acid acetic 1%             | 1 000 ml |
| 5. Soluția de spălare      |          |
| acid acetic                | 2 ml     |
| apă distilată              | 100 ml   |
| 6. Soluția de viraj        |          |
| acid acetic                | 10 ml    |
| acetat de sodiu            | 5 g      |
| apă distilată              | 100 ml   |
| 7. Soluția de eluare       |          |
| carbonat de sodiu          | 4 g      |
| metanol                    | 50 ml    |
| apă distilată              | 50 ml    |
| sau                        |          |
| NaOH                       | 4 g      |
| apă distilată              | 1 000 ml |

**Modul de lucru:** camera de electroforeză prevăzută cu cele două bacuri se așază pe o masă perfect orizontală (controlul cu bula de nivel) în apropierea redresorului. Se montează electrozii de platină strângându-se bine șuruburile de fixare și apoi cele două bacuri se încarcă cu soluția tampon, fiind aduse la același nivel cu ajutorul unui sifon. Hîrtia de filtru specială, tăiată fișii cu dimensiunile cerute de aparatul folosit (25 cm/2 cm) se numerează, se impregnează una câte una în soluția tampon și apoi se așază în aparat unde sînt fixate orizontal prin adeziune de ramele bacurilor. Capetele benzilor trebuie să fie introduse cel puțin 1 cm în soluția tampon din cele două bacuri. Apoi se conectează cuvele la redresor, se reglează amperajul (0,2 mA/cm lățime) și aparatul este lăsat în funcțiune 30' pentru echilibrarea sistemului. Se închide aparatul, se aplică serul de cercetat (0,005—0,01 ml) care trebuie să fie clar și nehemolizat. Aplicarea probei se face la capătul catodic (—) pe banda de hîrtie cu o micropipetă, printr-o mișcare pendulară pentru uniformizarea probei de analizat. Se redeschide aparatul pentru controlul migrării, se colorează serul amestecînd în el cîteva cristale de albastru de bromfenol. Colorantul migrează cu frontul albuminelor. Durata de migrare variază între 4—5 ore (migrare rapidă) sau între 16—18 ore (migrare lentă).

Desfășurarea lentă se face în următoarele condiții:

- tampon pH = 8,6 f.i. = 0,075 sau pH = 8,6 f.i. = 0,05
- tensiune la borne 110—120 V, amperajul 0,25—0,3 mA/cm lățime

bandă

Desfășurarea rapidă se face în următoarele condiții:

— tampon pH = 8,6 f.i. = 0,035 sau pH = 8,6 f.i. = 0,025;

— tensiunea la borne 320—350 V, amperajul 0,3—0,5 mA/lățime bandă.

Durata migrării unei electroforeze variază în funcție de caracteristicile tamponului, intensitatea curentului, grosimea și lungimea hîrtiei, cantitatea probei de cercetat aplicată și etanșeitatea aparatului (evaporare). Cînd desfășurarea migrării s-a terminat se închide aparatul, se scot benzile și se usucă la temperatura laboratorului. După uscarea benzilor sînt introduse într-o soluție de colorant. Colorantul cel mai folosit este albastrul de bromfenol cu concentrații variînd între 0,1—1 g‰.

Timpul de colorare a benzilor variază după concentrația colorantului de la 30 minute la 12 ore. Pentru soluții de 0,1‰ albastru de bromfenol durata de colorare este de 4—12 ore, pentru 1 g‰ este de 30 minute. Excesul de colorant se îndalătură trecînd proteinograma în 3 băi de spălare, 10 minute pentru primele 2 băi și 5 minute pentru ultima. Se trec apoi benzile 2 minute în baia de viraj, după care se usucă prin esorare cu hîrtie de filtru obișnuită și apoi 10—20 minute la 80°C în etuvă. Determinarea cantitativă se face prin măsurarea densității optice a colorantului fixat pe fracțiunile desfășurate electroforetic prin fotometrare directă (dispozitiv special) sau prin eluția colorantului din fiecare zonă și măsurarea densității optice a soluției obținute cu un fotometru obișnuit. Pentru eluarea spoturilor colorate se pregătesc 5 eprubete, prima eprubetă din serie purtînd numărul probei corespunzătoare. Luîndu-se benzile în ordinea numerotării, se taie cu foarfeca fiecare zonă colorată și se introduce în eprubeta corespunzătoare din seria de 5, în ordinea migrării: în prima eprubetă albuminele apoi  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , beta și gamaglobulinele. Tăierea se face pe zona cea mai puțin colorată dintre fracțiuni: aceasta nu se află totdeauna la mijlocul distanței dintre fracțiuni (unele fracțiuni sînt asimetrice) motiv pentru care se notează atent cu creionul locul de tăiere. Se pipetează în fiecare eprubetă cite 5 ml soluție de eluare peste fragmentele de hîrtie, se pune dopul și se agită puternic.

Pentru o bună eluare se lasă 30 minute. Extincția eluentului fiecărei fracțiuni se citește la  $\lambda = 590$  m $\mu$ , în cuve de 1 cm față de apă distilată care se află în cuva de compensație.

Se face suma extincțiilor celor 5 fracțiuni ale unei probe și se egalează cu 100. Prin regula de trei simplă se calculează procentajul fiecărei fracțiuni față de această sumă. Pentru a exprima fracțiunile în grame de proteine/100 ml ser, se vor determina proteinele totale ale fiecărui ser și se vor calcula cantitățile corespunzătoare fiecărei fracțiuni pe baza concentrațiilor procentuale obținute. La serul normal prin electroforeză pe hîrtie se disting 5 fracțiuni: albumină  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ , care cu excepția gamaglobulinelor migrează spre anod, fracțiunea  $\gamma$  care este electiv neutră migrează spre catod datorită electroendosmozei.

Tabelul LVII conține valorile fracțiunilor proteice obținute prin cele două procedee: eluare (E) și procedeu direct prin transparentizare (T).



| Autorii              | Metoda | Colorantul            | Albumina |           |         |     |
|----------------------|--------|-----------------------|----------|-----------|---------|-----|
|                      |        |                       | %        | E.S.*     | E.S.%** | %   |
| Schwartzkope         | E      | Amido-schwartz        | 66,6     | $\pm 3,3$ | $\pm 5$ | 3,3 |
|                      | Tr.    | "                     | 46,7     | 2,0       | 4,3     | 5,8 |
| Pezold și Kofes      | E      | "                     | 55,7     | 4         | 7       | 3,3 |
|                      | Tr.    | "                     | 64       | 2         | 3,1     | 3,3 |
| Dittmer              | E      | "                     |          | 1,2       |         |     |
|                      | Tr.    | "                     |          | 1,6       |         |     |
| Owen                 | E      | "                     | 66,9     | 1,75      | 2,6     | 4,4 |
|                      | Tr.    | "                     | 66,6     | 2,53      | 3,8     | 3,9 |
| Comoroșan și Mitrică | E      | Albastru de bromfenol | 62       |           |         | 3,8 |
|                      | Tr.    |                       | 65       |           |         | 4,2 |

\* E.S. = Eroare standard în valori absolute

\*\* E.S.% = Eroare standard, exprimată la sută față de valoarea dată.

În figura 4 a sint reprezentate schematic modificările electroforetice întâlnite în patologia clinică.

### Electroforeza glicoproteinelor pe hîrtie

#### Material și reactivi

1. Aparat de electroforeză
2. Hîrtie de filtru specială pentru electroforeză
3. Soluția tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,025 (aceeași ca și în cazul proteino-gramei)

#### 4. Soluție solvent

|                 |     |
|-----------------|-----|
| cloroform ..... | 2 v |
| metanol .....   | 1 v |

#### 5. Soluție de fixare

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| clorură mercurică ..... | 2 g    |
| alcool etilic .....     | 100 ml |

#### 6. Soluție oxidantă

|    |                       |        |
|----|-----------------------|--------|
| a) | acid periodic .....   | 2,4 g  |
|    | apă distilată .....   | 60 ml  |
| b) | acetat de sodiu ..... | 2,5 g  |
|    | apă .....             | 40 ml. |

Se face un amestec în părți egale de a + b la care se adaugă 200 ml alcool etilic. Se conservă maximum 7 zile la +4° și întunoric.

#### 7. Soluție reducătoare

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| iodură de potasiu .....  | 5 g    |
| tiosulfat de sodiu ..... | 5 g    |
| alcool etilic .....      | 150 ml |
| apă distilată .....      | 100 ml |



## proteice

| $\alpha_1$ -Globulina |          |     | $\alpha_2$ -Globulina |          |      | $\beta$ -Globulina |          |      | $\gamma$ -Globulina |            |
|-----------------------|----------|-----|-----------------------|----------|------|--------------------|----------|------|---------------------|------------|
| E.S.*                 | E.S.%**  | %   | E.S.*                 | E.S.%**  | %    | ES*                | ES%**    | %    | ES*                 | ES%**      |
| $\pm 0,6$             | $\pm 18$ | 5,7 | $\pm 0,7$             | $\pm 13$ | 8,5  | $\pm 1$            | $\pm 12$ | 15,6 | $\pm 1,6$           | $\pm 10,5$ |
| 0,7                   | 12       | 9,8 | 0,9                   | 9        | 13,2 | 0,7                | 5        | 24,8 | 2                   | 8          |
| 2                     | 60,6     | 8,7 | 2                     | 23,0     | 10   | 3                  | 30       | 21   | 7                   | 33,3       |
| 0,6                   | 6,9      | 8,7 | 0,6                   | 6,9      | 8,7  | 1,2                | 13,8     | 15   | 1                   | 66         |
| 0,5                   |          |     | 0,5                   |          |      | 0,7                |          |      | 1,2                 |            |
| 0,6                   |          |     | 0,8                   |          |      | 1                  |          |      | 1,4                 |            |
| 0,52                  | 11,48    | 6,9 | 0,55                  | 8        | 9,2  | 0,78               | 8,5      | 12,8 | 1,21                | 9,5        |
| 0,67                  | 17,2     | 6,2 | 0,77                  | 12,4     | 7,6  | 0,88               | 11,6     | 15,6 | 2,11                | 13,5       |
|                       |          | 7   |                       |          | 9,2  |                    |          | 18   |                     |            |
|                       |          | 6,2 |                       |          | 8,1  |                    |          | 18,9 |                     |            |

Înainte de întrebuintare se adaugă 0,45 ml acid clorhidric fumans d.1,19. Se întrebuintează numai o dată.

8. Soluție colorantă: reactiv Schiff: 2 g fuxină bazică sînt dizolvate în 400 ml apă distilată fierbinte. Soluția se răcește la 55°C și apoi se filtrează. Se adaugă 10 ml acid clorhidric 2 N (diluție 1/5 HCl concentrat) 4 g metabisulfid de potasiu și se completează cu 500 ml apă distilată. Se lasă în frigider la întuneric pînă a doua zi. Se adaugă 2,5 g cărbune activ se agită 10 minute și se filtrează prin hîrtie de filtru Whatman. La filtratul limpede se adaugă 25 ml HCl, d = 1,19, se amestecă și se încearcă punind o picătură pe o placă de sticlă lăsînd să se usuce. După uscarea pata nu trebuie să rămînă roșie. În caz contrar se mai adaugă 1—2 ml HCl 2 N și se controlează din nou. Se conservă soluția la +4° la întuneric și se folosește atîta timp cît este incoloră.

## 9. Soluție de spălare

metabisulfid de potasiu ..... 2 g  
 apă distilată ..... 500 ml  
 HCl d. 1,19 ..... 5 ml

## 10. Soluție de eluare:

NaOH ..... 4 g  
 apă ..... 100 ml

*Modul de lucru.* Desfășurarea migrării electroforetice este aceeași ca și pentru proteinogramă cu deosebirea cantității de ser adăugată care trebuie să fie de 2—3 ori mai mare. Benzile uscate se supun la următoarele operații:

1. Degresare 3 minute în soluție solvent
2. Fixare 3 minute în soluție de fixare
3. Spălare 5 secunde în apă distilată
4. Oxidare 8 minute în soluție oxidantă
5. Spălare 3 minute în apă distilată
6. Reducere 3 minute în soluție reducătoare

7. Spălare 5 secunde în apă distilată
8. Esorare cu hîrtie de filtru
9. Colorare 45 minute în reactiv Schiff

Benzile sînt spălate de 5 ori cîte 3 minute cu soluție reducătoare și se usucă întinse pe placa de sticlă la temperatura laboratorului.

Determinarea cantitativă a fracțiunilor colorate se face prin eluție.

Fracțiunile tăiate în fragmente mici se introduc în tuburi de centrifugă, fiecare tub conține 5 ml soluție NaOH/N. Tuburile se astupă și se lasă 2 ore la 70°C, apoi se adaugă în fiecare tub 5 ml alcool absolut. După răcire se adaugă 1 ml acid acetic glacial, se amestecă și se centrifughează.

Probele se citesc la fotocolorimetru pe scara de extincție în cuve de 1 cm la 550 mμ. Calculul este identic ca la proteine, la serul normal se disting 5 fracțiuni. Fracțiunile concentrate sînt situate între alfa<sub>1</sub>-alfa<sub>2</sub> globuline sub formă de complex glicolipidoproteic, între beta-gama sînt situate fracțiunile mai slab concentrate.

Tabelul LVIII conține valorile normale ale glicoproteinelor obținute prin electroforeză pe hîrtie, de diferiți autori.

Tabelul LVIII

Valorile glicoproteinelor(%)

| Autori                     | Albumina | Globuline      |                |       |       |
|----------------------------|----------|----------------|----------------|-------|-------|
|                            |          | α <sub>1</sub> | α <sub>2</sub> | β     | γ     |
| Raynaud                    | 3,5      | 10,70          | 28,60          | 28,60 | 28,60 |
| Biserte și Guerin          | 4,3      | 20,5           | 33,8           | 25,8  | 16    |
| Andreani                   | 15,2     | 7,5            | 29,4           | 30,5  | 17,4  |
| Hirsch-Marie               | 10,89    | 19,89          | 26,1           | 26,1  | 26,1  |
| Romani                     | 10,89    | 10,89          | 26,1           | 26,1  | 26    |
| Björnesjö                  | 13,1     | 17,9           | 27,9           | 23,8  | 17,2  |
| Sonnet J.                  | 12,6     | 20,4           | 26,5           | 23    | 17,5  |
| S. Comoroșan și N. Mitrică | 13       | 12             | 29,5           | 21,8  | 15—16 |

## Electroforeza lipoproteinelor pe hîrtie

### Material și reactivi

1. Aparat de electroforeză
2. Hîrtie de filtru specială pentru electroforeză
3. Soluție tampon veronal pH = 8,6 f.i. 0,025 (aceeași ca și pentru protei-nogramă)

### 4. Soluție de colorant

- a) Sudan negru B ..... 0,1 g
- Alcool 60° ..... 100 ml

Colorantul se pune în alcool 60°, se încălzește amestecînd cu atenție pînă la fierbere. După răcire se filtrează de 2 sau 3 ori.

- b) Sudan III ..... 1 g
- alcool 75° ..... 900 ml
- acetona ..... 100 ml



- c) roșu de ulei ..... 0,8 g  
 alcool 60° ..... 500 ml  
 alcool izopropilic ..... 25 ml

5. Soluție de spălare

- alcool ..... 60 ml  
 apă ..... 100 ml

6. Soluție de eluare

- alcool etilic absolut ..... 100 ml  
 acid acetic ..... 25 ml.

**Modul de lucru** — desfășurarea migrării electroforetice se efectuează în aceleași condiții ca pentru proteinograme. Singura deosebire constă în cantitatea de ser aplicată pentru lipidogramă care este de 7—10 ori mai mare decât în cazul proteinogramei.

Durata de colorare a lipoproteinelor variază în funcție de colorant: Pentru soluția de Sudan negru B 1‰ sînt suficiente 3 ore. Excesul de colorant se îndalăură trecînd lipidograma consecutiv în 3 băi de spălare cite 15 minute pentru fiecare. Lipidograma se usucă suspendată la aer și prezintă fracțiuni colorate în regiunea alfa și beta-globulinelor. Determinarea cantitativă a acestor fracțiuni se face numai prin eluție. Spoturile colorate precum și o porțiune din banda din afara zonei de migrare sînt tăiate și introduse în tuburi numerotate. Fiecare fracțiune se eluează în 5 ml soluție de eluent.

Probele se citesc la fotocolorimetru în cuve de 1 cm la  $\lambda = 590$  m $\mu$ . Citirea se face față de blancul benzii, obținut din fondul hirtiei a cărei culoare nu mai este neglijabilă ca la proteinogramă. Calculul este identic ca la proteine. La serul normal se disting 2 fracțiuni lipoproteice: alfa și beta.

**Calcul:** se face procentajul celor două fracțiuni și raportul între beta/alfa.

Originea și constituenții principali sînt redați în tabelul LIX.

Tabelul LIX

Fracțiunile lipoproteice

| Fracțiunea electroforetică       |                                          | Valoarea procentuală a principalilor constituenți |               |            |             | Origine                       |
|----------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------|------------|-------------|-------------------------------|
|                                  |                                          | Proteine                                          | Triglice-ride | Colesterol | Fosfolipide |                               |
| Chilomicroni                     | Apar numai după un prinz bogat în lipide | 2                                                 | 85            | 5          | 8           | Originea alimentară (exogenă) |
| Beta-lipo-proteine               | Valori normale 52—60%                    | 21                                                | 11            | 45         | 22          | Endogenă (sinteză în ficat)   |
| Pre-beta-lipoproteine            | Pînă la 20% la seruri patologice         | 8                                                 | 50            | 19         | 18          | Endogenă (sinteză în ficat)   |
| Alfa <sub>1</sub> -lipo-proteine | Valori normale 25—35%                    | 50                                                | 8             | 17         | 22          | Endogenă (sinteză în ficat)   |



Prima fracțiune situată între albumine și  $\alpha$ -globuline conține 10—25% din colesterol seric și fosforul lipidic. A doua fracțiune situată între  $\beta$  și  $\gamma$  conține lipoproteine care migrează foarte încet.

Tabelul LX conține valorile normale ale fracțiunilor lipidice obținute prin electroforeză pe hirtie de diferiți autori.

Tabelul LX

Valorile lipoproteinelor

| Autori                     | Colorant     | $\alpha$ (%) | $\beta$ (%) |
|----------------------------|--------------|--------------|-------------|
| G. Biserte                 | Sudan negru  | 22           | 52          |
| R. Joyeuse                 | Sudan negru  | 25           | 74          |
| F. Franken                 | Sudan negru  | 20           | 80          |
| W. Haag                    | Sudan negru  | 27,3         | 72,7        |
| A. Nijs                    | Sudan negru  | 23,8         | 70,3        |
| G. Ricci                   | Sudan negru  | —            | —           |
| G. Schettler               | Sudan negru  | 20           | 80          |
| R. Wieme                   | Sudan negru  | 25—30        | 45—50       |
| E. Sohar                   | Roșu de ulei | 35,3         | 52,4        |
| S. Comoroșan și N. Mitrică | Sudan negru  | 28,5         | 56—58       |

Electroforeza proteinelor în gel

Material și reactivi

1. Aparat de electroforeză

2. Lame de microscop (2,5/7,5 cm)

Hirtie de filtru pentru punțile care fac legătura dintre agar și cuva cu tampon.

3. Tampon pH = 8,6 f.i. = 0,05

Na dietilbarbituric ..... 10 g

acid dietilbarbituric ..... 1,5 g

merthiolat de sodiu ..... 0,1 g

apă distilată ..... 1 000 ml

4. Gel de agar Noble Difco 1% în tampon pH = 8,6, f.i. = 0,025.

5. Soluție de fixare:

alcool ..... 100 ml

H<sub>2</sub>O ..... 60 ml

acid acetic glacial ..... 1,5 ml

6. Coloranți: albastru de bromfenol 0,1%<sub>00</sub>

albastru de bromfenol ..... 0,1 g

sulfat de zinc ..... 50 g

acid acetic glacial ..... 50 ml

apă distilată ..... 1 000 ml

7. Soluție de spălare:

acid acetic glacial ..... 2 ml

apă distilată ..... 100 ml

### 8. Soluție de viraj:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| acid acetic .....     | 10 ml  |
| acetat de sodiu ..... | 2 g    |
| apă distilată .....   | 100 ml |

### 9. Soluție de eluare:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| hidrat de sodiu ..... | 0,4 g  |
| apă distilată .....   | 100 ml |

### Modul de lucru

*Prepararea gelului de agar 1% în tamponul veronal pH 8,6 f.i. 0,025.*

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| agar Noble Difco .....          | 10 g   |
| apă distilată .....             | 500 ml |
| tampon veronal pH = 8,6, f.i. = |        |
| = 0,05 .....                    | 500 ml |
| merthiolat de sodiu .....       | 0,1 g. |

După ce agarul a fost lăsat în apă distilată 24 de ore la temperatura laboratorului, se adaugă tampon veronal și se pune la fiert (în baia de apă). Se lasă 1/2 oră să fiarbă, apoi se filtrează prin vată sau sită de mătase, se repartizează în tuburi de circa 10—15 ml și se păstrează la +4°C — +10°C. Pentru a nu se evaporă tuburile sînt astupate cu dopuri de cauciuc.

În momentul folosirii tubul de gel de agar se lichefiază în baie de apă la fierbere.

Nu se recomandă ca același tub de agar să fie încălzit pentru lichefiere de mai multe ori. Lamele de sticlă spălate, degresate și uscate sînt așezate pe o suprafață perfect orizontală (controlată cu o bulă de nivel).

În cazul electroforezei în gel pe suport de hirtie de filtru se acoperă lama de microscop cu o hirtie de filtru Whatman sau hirtie de filtru obișnuită de 2,5/14 cm. Această lungime este necesară la fixarea hirtiei de filtru în vederea turnării gelului precum și ca o punte de legătură dintre gel și tamponul din cuve. Hirtia de filtru Whatman sau obișnuită este în prealabil umețată cu tampon veronal.

Gelul în cantitate de 0,17 ml/cm<sup>2</sup> se toarnă cu o pipetă (spartă la vîrf) pe mijlocul lamei de sticlă sau al lamei acoperite cu hirtie de filtru, pe care s-a marcat locul de aplicare a probei, numărul probei de cercetat, precum și poziția catodului și anodului. Turnarea se face astfel încît după gelificare întreaga suprafață a gelului, să fie uniformă. Lamele sînt lăsate la temperatura laboratorului, pentru gelificare și apoi sînt așezate în camera de electroforeză.

*Camera de electroforeză* — confecționată din material plastic, este instalată pe o masă fixă, perfect orizontală și este alcătuită din 2 bacuri mobile care conțin tampon și în care se fixează cei doi electrozi. Este acoperită cu un capac de sticlă sau material plastic. Alături se află redresorul care are instrucțiuni proprii de funcționare. La extremitățile lamelor se aplică două hirtii de filtru, în cazul turnării gelului direct pe lamă, iar în cazul turnării gelului pe suport de hirtie, legătura între gel și tampon, se face numai cu o singură hirtie de filtru, a doua fiind tăiată odată cu hirtia suport.

Aceste hirtii de filtru sînt îndoit la capete astfel încît se acoperă exact 1/2 cm din lungimea lamei, iar celălalt capăt face legătura cu tamponul din rezervorul în care se află și electrozii. Aplicarea probei de cercetat se face prin așezarea cu o pensă fină, pe locul marcat, a unei bucăți de hirtie de filtru (1—1,5/0,1—0,2 cm) îmbibată în proba de analizat, căreia în prealabil i s-a adăugat albastru de bromfenol. După conectarea camerei umede cu redresorul prin



intermediul electrozilor, se dă drumul curentului electric care trebuie reglat în funcție de numărul de probe: 5—10 volți pe cm/lungime sau 0,8—1 mA pe centimetrul lățime.

Hirtiile de filtru care au fost îmbibate cu probele de analizat sînt scoase după 15—20' de la începerea migrării. Durata migrării depinde de caracteristicile tamponului, lungimea lamelor, mărimea suportului îmbibat cu probe de analizat și grosimea stratului de gel, intensitatea curentului, evaporare.

În general, migrarea pentru lame de 8,5 cm/2,5 cm se realizează în 4—6 ore.

#### Prelucrarea electroforezelor:

a) *Fixarea*: după întreruperea curentului electric, punțile de hirtie de filtru adăugate sînt înlăturate și în cazul electroforezei pe suport de hirtie, hirtia suport este îndoită pe spatele lamei. Lamele astfel pregătite sînt lăsate în soluția fixatoare timp de 3—24 ore.

b) *Uscarea*: Lamele scoase din soluția fixatoare se așază pe o placă de sticlă acoperită cu hirtie de filtru obișnuită, apoi pe suprafața gelului se așază o altă hirtie de filtru care să adere perfect la gel. Pe deasupra se pun bucăți de hirtie tăiate în pătrate mici și totul se acoperă cu o placă de sticlă. Hirtiile mici umezite se schimbă de 2—3 ori, operație necesară pentru uscarea omogenă și pentru absorbția excesului de săruri din gel care altfel ar cristaliza la suprafață. În final lamele sînt uscate la 80°.

Colorarea se face în soluție de albastru de bromfenol 0,1%, timp de 24 ore. Excesul de colorant se îndepărtează prin 3 băi de spălare, prima de 10', următoarele două în 5', iar intensificarea spoturilor se accentuează cu ajutorul băii de viraj, 2 minute. Proteinograma astfel pregătită este uscată la 80°. Determinarea cantitativă a fracțiunilor proteice se efectuează prin fotometrie directă, cînd gelul a fost turnat pe lama de sticlă sau prin procedeul de eluare cînd gelul a fost turnat pe suport de hirtie. Pentru eluare se pregătesc serii de 5 eprubete pentru fiecare probă. Prima eprubetă se notează cu numărul probei. Spoturile colorate de pe fiecare bandă, în ordinea numerotării, sînt tăiate mărunt și introduse în eprubeta corespunzătoare. În prima eprubetă sînt albuminele, apoi  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , și  $\gamma$ -globulinele. În fiecare eprubetă se pipetează cite 5 ml soluție eluent pentru fragmentele tăiate, se lasă 30 minute pentru o eluare completă, apoi se măsoară extincția eluentului la 590 m $\mu$ , în cuve de 1 cm față de apa distilată. Se face suma extincțiilor celor 5 fracțiuni ale unei probe de ser și se egalează cu 100. Prin regula de trei simplă, se calculează procentajul fiecărei fracțiuni față de această sumă. La serul normal se disting 5 fracțiuni: albuminele,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ .

Pentru a exprima fracțiunile în grame de proteină la 100 ml ser se vor determina proteinele totale ale fiecărui ser și se vor calcula cantitățile corespunzătoare fiecărei fracțiuni pe baza concentrației procentuale obținute.

#### Electroforeza glicoproteinelor în gel

##### Material și reactivi:

1. Aparat de electroforeză
2. Lame de sticlă (2,5/7,5).

Hirtie de filtru pentru punțile care fac legătura dintre agar și cuvele cu tampon.

3. Soluție tampon pH 8,6 f.i. = 0,05 (același ca la electroforeza proteinelor în gel).



4. Gel de agar 1% în tampon veronal pH 8,6 f.i. = 0,025 (același ca la electroforeza proteinelor în gel).

5. Tamponul acetat de sodiu M/10:

- |                       |                           |          |
|-----------------------|---------------------------|----------|
| — acetat de sodiu M/5 | — Acetat de sodiu anhidru | 16,4 g   |
|                       | — Apă distilată           | 1 000 ml |
| — acid acetic M/5     | — Acid acetic             | 12 ml    |
|                       | — Apă distilată           | 1 000 ml |

Aceste două soluții sînt amestecate în următoarele proporții:

- soluție acid acetic M/5 = 25,5 ml
- soluție acetat de Na M/5 = 24,5 ml
- apă = 50 ml.

6. Soluție de fixare:

clorhidrat de hidroxilamină 10%:

- clorhidrat de hidroxilamină 10 g
- tampon acetat de sodiu pH 4,7 100 ml

7. Acetat de sodiu N/10:

- acetat de sodiu 8 g
- apă distilată 100 ml

8. Soluție oxidantă: acid periodic 1%

- acid periodic 1 ml
- acetat de sodiu N/10 100 ml

9. Colorant: reactiv Schiff:

2 g fuxină bazică sînt dizolvate în 400 ml apă distilată fierbinte; soluția se răcește la 55°C și apoi se filtrează. Se adaugă 10 ml acid clorhidric 2N (diluât 1/5 HCl conc.) 4 g metabisulfid de potasiu și se completează la 500 ml cu apă distilată, se lasă la frigider la întuneric pînă a doua zi. Se adaugă 2,5 g cărbune activ, se agită 10 minute și se filtrează rapid prin hîrtie de filtru Whatman. La filtratul limpede, se adaugă 25 ml HCl d = 1,19, se amestecă și se încearcă punînd o picătură pe o placă de sticlă, lăsînd să se usuce. După uscarea pata nu trebuie să rămînă roșie. În caz contrar, se mai adaugă 1—2 ml HCl 2 N și se controlează din nou. Se conservă soluția la +4° la întuneric și se folosește atîta timp cît este incoloră.

10. Soluție de spălare: apă sulfuroasă

- apă sulfuroasă — 50 ml metabisulfid de sodiu 10%
- metabisulfid de sodiu .. 10 g
- apă distilată ..... 100 ml

— 50 ml acid clorhidric 2 N

- acid clorhidric d 1,19 17,5 ml
- apă distilată ..... 82,5 ml

Se amestecă 50 ml metabisulfid de sodiu 10% cu 60 ml acid clorhidric 2 N și se completează la 1000 ml cu apă distilată.

11. Soluție reducătoare: apă sulfuroasă glicerinată

- apă sulfuroasă glicerinată — glicerină .. 20 ml
- apă sulfuroasă
- preparată ca mai sus.... 80 ml

Toți reactivii, în afară de reactivul Schiff se prepară înainte de întrebuintare.

*Modul de lucru:* electroforeza în gel a glicoproteinelor se efectuează pînă la faza de colorare în același mod ca electroforeza în gel a proteinelor.

Deosebirea constă în cantitatea serului de cercetat care în cazul glicoproteinelor este de 3 ori mai mare. După fixare și uscare, glicoproteinele sînt menținute 15 minute în soluție de clorhidrat de hidroxilamină, sînt apoi spălate 15 minute cu apă curentă, iar apoi lăsate în soluția de acid periodic 10 minute.

După aceea, lamele sînt spălate 10 minute cu apă curentă și trecute pentru 3 minute în reactiv Schiff diluat 1/2 cu apă distilată înainte de întrebuințare. După colorare, glicoproteinele sînt spălate cîte 2 minute cu apă sulfuroasă în trei băi succesive. Spălarea se continuă cu apă sulfuroasă glicerinată, în 3 reprize de cîte o oră fiecare. Uscarea se face la 80—100°, urmînd determinarea cantitativă.

Determinarea cantitativă a fracțiunilor glicoproteice se efectuează ca și la proteine prin fotometrare directă cînd gelul a fost turnat pe lama de sticlă, sau prin procedeul de eluare la  $\lambda = 500$  m $\mu$  cuve de 1 cm cînd gelul a fost turnat pe hîrtie de filtru.

În acest caz citirea se va face față de blancul benzii obținut din fondul hîrtiei eluate, a cărei culoare nu mai este neglijabilă ca la proteinogramă. Calculul este identic ca în cazul determinării proteinelor prin electroforeza în gel. La serul normal se disting 5 fracțiuni.

#### Electroforeza lipoproteinelor în gel

##### Materiale și reactivi:

1. Aparat de electroforeză
2. Lame de microscop (2,5/7,5)
3. Hîrtie de filtru pentru punțile de legătură dintre gel și tampon.
4. Tampon veronal pH 8,6 f.i. = 0,05 (același ca la electroforeza proteinelor în gel).
5. Gel de agar 1% în tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,025 (același ca la electroforeza proteinelor în gel).
6. Soluții de fixare (același ca la electroforeza proteinelor în gel).
7. Coloranți:

a) Sudan negru B

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Sudan negru B ..... | 0,7 g  |
| alcool 60° .....    | 100 ml |

b) Sudan III

|                  |        |
|------------------|--------|
| Sudan III .....  | 1 g    |
| alcool 75° ..... | 900 ml |
| acetonă .....    | 100 ml |

c) Roșu de ulei (oil red O)

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| oil red O .....          | 0,8 g  |
| alcool 60° .....         | 500 ml |
| alcool izopropilic ..... | 25 ml  |

Soluțiile de coloranți se prepară astfel: colorantul se pune în alcool, se încălzește pînă la fierbere cu refrigerent sau fără refrigerent, cu mare atenție. Soluția caldă se filtrează de 2 sau 3 ori.

8. Soluții de spălare

|                     |        |
|---------------------|--------|
| alcool etilic ..... | 50 ml  |
| apă distilată ..... | 100 ml |

9. Soluții eluente

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| alcool etilic .....       | 300 ml |
| acid acetic glacial ..... | 100 ml |



*Modul de lucru:* electroforeza în gel a lipoproteinelor se efectuează în aceleași condiții ca electroforeza în gel a proteinelor plasmatice până la faza de colorare. Singura deosebire constă în cantitatea serului de cercetat, care în cazul lipoproteinelor este de 7—10 ori mai mare.

După fixare, lamele se introduc în unul din coloranții specifici lipoproteinelor, în Sudan negru B, menținerea 3 ore este suficientă. Excesul de colorant se îndepărtează prin spălare cu soluțiile respective în 3 reprize, timp de 10' fiecare. Determinarea cantitativă se realizează prin fotometrare directă când gelul a fost turnat direct pe lama de sticlă sau prin eluare și fotometrare la  $\lambda = 590$  m $\mu$ , cuve de 1 cm, când gelul a fost turnat pe hirtie de filtru. În acest caz citirea se face față de blancul benzii obținute din fondul suportului eluat, calcul identic ca în cazul proteinelor plasmatice. La serul normal se disting 2 factori lipoproteici: alfa și beta și uneori gama-kilomicroni care nu migrează electroforetic și rămâne la start.

#### Electroforeza lipoproteinelor în gel de agaroză

##### Material și reactivi

1. Tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,05 (același ca la electroforeza proteinelor în gel).

2. Agaroză 0,8% în tampon veronal

3. Soluție fixatoare

4. Colorant

5. Soluții spălare.

##### Materiale

1. Aparat de electroforeză

2. Lame de microscop

3. Stanță pentru tăiat gelul

##### Modul de lucru:

Se lichefiază agaroză în baie de apă, după care se toarnă 2,5 ml pe fiecare lamă. Se lasă la temperatura camerei 15 minute și apoi la 1 cm de la capătul benzii se taie un șanț lung de 1,5 cm și lat de 1 mm, din care se scoate gelul de agaroză. Pe locul rămas liber se toarnă un strat subțire de agaroză, apoi serul. Se introduce lama în aparat, se face legătura cu tamponul și se execută întocmai ca la electroforeză (0,2 mA/cm lățime a lamei).

În 1—1½ oră (în funcție de intensitatea curentului) se separă fracțiunile lipoproteice. După închiderea aparatului acestea se fixează prin introducerea 15' într-o baie de acid acetic 5%, după care se usucă sub hirtie de filtru umed.

După uscare se colorează cu negru de Sudan 1%. Se spală în mai multe băi de alcool 50% până când fondul lamei rămâne incolor. Se usucă și se integrează punându-se în evidență 3 fracțiuni și anume: lipoproteina alfa<sub>1</sub>, lipoproteina pre-beta, lipoproteina beta reprezentate schematic în figura 4 b.

##### Valori normale:

|                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| $\alpha_1$ -lipoproteine : | 22—38%                  |
| pre- $\beta$ „ :           | 8—20%                   |
| $\beta$ „ :                | 49—60%                  |
| $\gamma$ -kilomicroni :    | 0—0,4% care nu migrează |

electroforetic.



## Electroforeza în gel de poliacrilamidă

Electroforeza în gel de poliacrilamidă poate fi făcută în poziție verticală (metoda disc-electroforezei) sau în poziție orizontală (metoda pe plăci).

Această metodă este folosită numai în cercetare pentru controlul purității fracțiunilor proteice.

### Material și reactivi

1. Redresor.  
2. 2 blocuri din material plastic în care sunt inserate tuburile care conțin gel.

3. Tuburi din sticlă de capacitate egală (metoda disc-electroforeză).

4. Parafilm sau plastilină.

5. Tampon TRIS pH = 8,9

TRIS ..... 4,5 g

HClN ..... 6 ml

apă ..... 100 ml

6. Tampon TRIS pH = 8,3

TRIS ..... 0,6 g

glicocol ..... 2,8 g

apă ..... 1 000 ml

7. Acrilamidă

8. Bisacrilamidă

9. TEMED

10. Persulfat de sodiu

11. Soluție albastru de bromfenol

albastru de bromfenol ..... 1 mg

apă ..... 100 ml

12. Soluție de sucroză 20%

sucroză ..... 20 g

apă ..... 100 ml

sau

1 picătură de glicerină ca atare.

13. Soluție de colorare

— amidoschwartz ..... 1 g sau 0,1—0,2‰

— acid acetic 7% ..... 100 ml

Acid acetic 7%:

— acid acetic ..... 7 ml

— apă ..... 100 ml

14. Soluții de decolorare

— acid acetic 7%

15. Gelul de acrilamidă.

Gelurile de acrilamidă se obțin prin polimerizarea acrilamidei sub acțiunea activatorului metilen bisacrilamidă.

Formarea polimerului poate fi indusă pe cale fotochimică sau chimică. Fotopolimerizarea se face în lumină fluorescentă în prezența de N, N, N', N' tetrametilendiamidă (TEMED), iar polimerizarea chimică cu amestec de catalizatori persulfat de amoniu și TEMED (0,2 g%).

Reacția nu are loc în prezența oxigenului atmosferic. Polimerizarea este completă după 3 ore.

Concentrația de monomer poate varia de la 3—30%.

În tabelul LXI se dau grame substanțe % ml amestec acrilamidă.

**Geluri de acrilamidă**  
(grame substanță % ml amestec acrilamidă)

| acrilamidă monomer | bisacrilamidă activator | persulfat de amoniu catalizator | TEMED catalizator | timp de gelificare (minute) |
|--------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| 3%                 | 0,08 g                  | 0,03—0,06 g                     | 10—20 $\mu$ l/l   | 3—5                         |
| 5%                 | 0,13 g                  | 0,02—0,03 g                     | 10—20 $\mu$ l/l   | 2—4                         |
| 7%                 | 0,18 g                  | 0,01—0,02 g                     | 8—15 $\mu$ l/l    | 1—3                         |
| 9%                 | 0,24 g                  | 0,01—0,02 g                     | 8—15 $\mu$ l/l    | 1—2                         |

Timpul de pregelificare este durată de scurgere de la adăugarea catalizatorului până la începerea gelificării.

#### Metoda disc-electroforeză

##### Modul de lucru:

Prepararea gelului de acrilamidă. Se dau 2 metode:

*Metoda I:* într-un cilindru gradat de 25 ml cu dop rodat se pun 1,7 g acrilamidă și 0,05 g bisacrilamidă. Se adaugă 24 ml tampon TRIS pH = 8,9 se agită și se adaugă 10  $\mu$ l TEMED, agitându-se și 0,25 ml sol. persulfat (se cîntăresc 0,07 g persulfat care sînt dizolvate într-un mililitru apă, din care se iau apoi 0,25 ml). Se agită bine și se repartizează amestecul cu ajutorul unei pipete în tuburi în prealabil astupate la capătul de jos cu plastilină sau parafilm (metoda disc-electroforeză).

##### Metoda II:

Se prepară soluțiile 1, 2, 3 și 4 care sînt păstrate la frigider timp îndelungat, iar în momentul întrebuițării se face amestecul după formula de mai jos.

##### Soluția 1:

acrilamidă ..... 28 g  
bisacrilamidă ..... 0,75 g  
apă distilată adus la 100 ml

##### Soluția 2: tampon pH = 8,9

NaCl 1N ..... 48 ml  
TRIS ..... 36,6 g  
TEMED ..... 0,23 ml

##### Soluția 3:

persulfat de amoniu ..... 0,28 g  
apă distilată adus la 100 ml

##### Soluția 4:

apă distilată

##### Amestec:

2 volume soluția 1 + 1 volum soluția 2 + 4 volume soluția 3 + 1 volum soluția 4.

Se agită și apoi tuburile sînt umplute ca în cazul metodei I.  
Se recomandă ca înălțimea stratului de poli-acrilamidă să fie aceeași în toate tuburile. Cu ajutorul unei pipete Pasteur bine efilată se umple spațiul rămas liber din tub, cu apă distilată și se lasă până a doua zi.



13.1 Cantitățile de mai sus au fost date pentru un aparat în care se pun 6 tubulețe de 8 cm lungime și cu un  $\varnothing$  de 0,5 cm. În cazul altor dimensiuni de tuburi se vor mări cantitățile păstrându-se însă proporțiile.

Punerea probei: 0,01 ml probă trebuie să conțină 600—1 000  $\mu$ g proteină. În 0,01 ml probă se adaugă sucroză pentru a forma o soluție 10% (deci 0,01 g) sau glicerină.

Tubulețele sînt fixate în partea de sus a aparatului (după ce în prealabil s-a scos parafilmul și apa de deasupra) și apoi sînt scufundate în cuva inferioară 1—2 cm intrînd în tampon.

În cele 2 cuve (de sus și de jos) se pun cîte 200 ml tampon TRIS pH = 8,3, sau cantitatea necesară în funcție de dimensiunile cuvelor cu care se lucrează.

Se lasă sistemul de echilibrare 1—2 ore. Se reglează amperajul 4 mA/pe tub și se lasă gelul pentru echilibrare.

Se oprește apoi aparatul și se pune proba direct în fiecare tub, fără a-l scoate din cuvă.

Timpul de migrare este de aproximativ 4 ore, migrarea probei se observă după nivelul colorantului. După migrare se oprește aparatul și se scoate cu grijă gelul din tub cu ajutorul unei seringi. Se lasă gelul în colorant de la 10' la 30' apoi urmează decolorarea.

#### *Metoda pe plăci*

Gelul poate fi turnat și într-o cuvă de plastic iar după gelificare se poate tăia exact după dimensiunile aparatului de electroforeză.

Gelul este pus pe un suport și lăsat să migreze în aparatul de electroforeză, legătura cu bacurile făcîndu-se cu hîrtie de filtru obișnuită. Pentru o placă de sticlă cu dimensiuni de  $6,5 \times 30 \times 0,3$  sînt necesare aproximativ 6 ore de migrare atunci cînd se aplică o diferență de potențial de 500 v. Etapele de lucru, colorarea și decolorarea sînt identice cu tehnica descrisă pentru metoda disc-electroforeză.

#### **Electroforeza proteinelor în acetat de celuloză**

##### *Material și reactivi*

1. Aparat de electroforeză
2. Benzi de cellogel procurate din comerț
3. Tampon veronal de Na 0,04 M (8,24 g/litru)
4. Soluție de colorare Ponceau S.

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Ponceau S             | 0,5 g  |
| acid tricloracetic 5% | 100 ml |

Acid tricloracetic 5%:

|                    |      |
|--------------------|------|
| acid tricloracetic | 5 ml |
|--------------------|------|

|     |       |
|-----|-------|
| apă | 95 ml |
|-----|-------|

Mai pot fi utilizați coloranții: Azocarmin B sau amidoschwartz.

5. Soluție de decolorare — Acid acetic 5%

|             |      |
|-------------|------|
| acid acetic | 5 ml |
|-------------|------|

|                  |       |
|------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O | 95 ml |
|------------------|-------|

6. Soluție de eluare — soluție 80% acid acetic

|             |       |
|-------------|-------|
| acid acetic | 80 ml |
|-------------|-------|

|                  |       |
|------------------|-------|
| H <sub>2</sub> O | 20 ml |
|------------------|-------|

*Modul de lucru:* cellogelul este un gel de acetat de celuloză. Benzile de cellogel conservate în pungi de plastic ermetic închise în prezența de metanol 90% sînt scoase și impregnate în soluție tampon. Excesul de tampon este îndepărtat cu ajutorul unor fișii de hîrtie de filtru și apoi benzile sînt așezate



în aparatul de electroforeză care se reglează pentru migrare. Se face o echilibrare a sistemului, iar apoi în zona catodică este aplicat spotul de hirtie de filtru imbibat cu proba de cercetat. Proba se pune în cantitate de aproximativ 0,5  $\mu$ l. Se dă drumul la aparat pentru migrare, voltajul fiind de 200 Volți, durata de 15—20'.

După migrare se oprește aparatul și benzile migrate se pun în colorant, iar apoi se decolorează prin spălare în 3—4 băi succesive de acid acetic 5%.

Determinarea cantitativă a fracțiunilor proteice se face cu ajutorul integratorului.

### Electroforeza în gel de amidon

Aplicarea în laboratorul clinic a acestei tehnici, constă în determinarea haptoglobinelor și nu a proteinelor care se pot determina mai ușor și exact prin metode simple și intrate în uzul curent al laboratoarelor.

Determinarea haptoglobinelor se face numai din punct de vedere calitativ. După numărul de haptoglobine apărute se pot trage concluzii în privința paternității.

#### Material și reactivi

##### 1. Aparat de electroforeză

##### 2. Lame de sticlă 15 cm lungime (4 cm lățime)

##### 3. Tampon borat — hidroxid de sodiu pH = 8,9

acid boric ..... 1 g

hidroxid de sodiu N ..... 12 ml

apă distilată ..... 1 000 ml

##### 4. Tampon borat — hidroxid de sodiu pH = 8,4

acid boric ..... 18 g

hidroxid de sodiu N ..... 60 ml

apă distilată ..... 1 000 ml

##### 5. Amidon de cartofi hidrolizat

##### 6. Soluție de colorare: soluție de benzidină

soluție de benzidină 1% în

metanol ..... 10 ml

metanol ..... 60 ml

apă oxigenată de 10 volume .. 10 ml

soluție tampon acetat-acid acetic 10 ml

Soluție tampon acetat-acid acetic format din:

9 volume soluție 1 și 11 volume soluție 2

##### Soluție 1:

acetat de Na cristalizat ..... 27 g

apă distilată ..... 1 000 ml

##### Soluție 2:

acid acetic densit. 1,049 ..... 11,5 ml

apă distilată ..... 1 000 ml

##### Soluție de spălare:

metanol..... 5 părți

acid acetic ..... 1 parte

apă ..... 5 părți

#### Modul de lucru:

Prepararea amidonului de cartofi hidrolizat:

250 g amidon + 500 ml acetonă acidulată cu HCl 0,5% se pune la termo-

stat la 40° de la o zi la alta. A doua zi se amestecă bine și se mai lasă 40 la termostațat, oprindu-se hidroliza cu 150 ml acetaț de sodiu molar

acetaț de sodiu anhidru ..... 16 g  
apă distilață ..... 1 000 ml

Se spală prin pilnie Büchner la vid cu 5 litri apă distilață și apoi cu încă 2—3 l acetonă. Se usuă la termostațat.

Preparațea gelului de amidon în tampon borat:

11 g amidon hidrolizaț sint introduce în 100 ml tampon borat pH = 8,9; 75 ml se pun la fiert (pină începe să degaje bule) iar în ceilați 25 ml se pune amidon. Tamponul cu amidon se toarnă peste tamponul luat de pe foc și se amestecă bine (cu o paletă de lemn). Gelul de amidon bine amestecat și cald se toarnă pe lame de sticlă care la extremități au fixate cele 2 benzi de hirtie de filtru umectate în tampon care fac legătura între gel și tamponul din cuve pH = 8,4. Gelul se toarnă în cantitatea necesară care să corespundă la o înălțime de 1 cm.

Proba de cercetaț constituită din Hb este diluață 1/5 cu ser fiziologic. Aplicațea ei se poate face prin:

— aplicațea unei hirtii de filtru (1,5 cm lung./1 cm lățime) îmbibață cu ser de cercetaț;

— tăierea pe toată lungimea gelului, a unei fante de gel de 1 mm lărgime în care se introduce fie hirtie de filtru îmbibață în ser, sau serul înglobaț în amidon, preparaț astfel: pe o sticlă de ceas se pun 20—40  $\mu$ l și se adaugă o cantitate suficientă de tampon borat și de amidon pentru a obține o pasta destul de fluidă care să poaț curge în „fantă“.

După aceasță pregățire se conectează cuva la redresor și se reglează amperajul 2 mA/cm lățime banda. După migrare care depinde de număruț probelor, caracteristicile tamponului și a gelului se oprește aparatuț, se face o secțiune longitudinală a gelului de amidon cu ajutoțul unui fir de oțel, coardă de vioară etc.

Se separă 2 benzi care se introduc timp de 2 minute în soluție de colorant — benzină. Pentru eliminațea excesului de colorant se lasă gelul 24 h în soluția de spălare.

### METODE CROMATOGRAFICE

Cromatografia este o metoda de separare între două faze heterogen nemiscibile a mai multor componente chimice dintr-un amestec. Componentele se distribuie în mod diferit într-o fază staționară (fixă) cu suprafață mare și una mobilă. În funcție de suportul folosit ca fază staționară există diferite tipuri de metode cromatografice:

- cromatografie de partiție
- cromatografie de absorbtie

### CROMATOGRAFIA DE PARTIȚIE

Cromatografia de partiție constă în separarea componentelor dintr-un amestec pe baza coeficientului de repartiție diferit, între două lichide parțial miscibile:

- fază apoasă
- solvenți neapoși.

Faza apoasă este staționară într-un suport de hirtie de filtru, cu porozitate constantă.



Hirtia de filtru utilizată în cromatografie, trebuie să posede anumite caracteristici ca: densitate, omogenitate și puritate. Pentru o desfășurare corectă petele sint așezate în lungimea hirtiei de filtru, adică în direcția fibrelor. Direcțiile fibrelor pe hirtia de filtru pot fi ușor constatate prin aplicarea unei picături de apă: axa mai lungă a elipsei formate, indică direcția fibrelor.

În tabelul LXII sint date caracteristicile unor hirtii de filtru des folosite în metoda cromatografiei de partiție.

Tabelul LXII

Hirtiile de filtru folosite în metoda cromatografică

| Sortiment         | Grosime (mm) | Viteză de migrare |
|-------------------|--------------|-------------------|
| Schleicher Schüll |              |                   |
| 2040 a            | 0,18—0,19    | Rapidă            |
| 2040 b            | 0,22—0,24    | Rapidă            |
| 2043 a            | 0,18—0,19    | Mijlocie          |
| 2043 b            | 0,20—0,22    | Mijlocie          |
| 2045 a            | 0,16—0,17    | Lentă             |
| 2045 b            | 0,15—0,17    | Lentă             |
| 598 G             | 0,25—0,28    | Rapidă            |
| 2315              | 0,29—0,32    | Rapidă            |
| 2316              | 0,29—0,32    | Rapidă            |
| 60                | 0,16         | Mijlociu-lentă    |
| 607               | 0,17         | Lentă             |
| 598 YD            | 0,26         | Rapidă            |
| Arches            |              |                   |
| 301               | 0,24         | Lentă             |
| 302               | 0,24         | Lentă             |
| 304               | 0,32         | Lentă             |
| Whatman           |              |                   |
| 1                 | 0,16         | Mijlociu-lentă    |
| 2                 | 0,18         | Mijlociu-lentă    |
| 3                 | 0,36         | Mijlocie          |
| 4                 | 0,19         | Rapidă            |
| 20                | 0,16         | Lentă             |
| 31 — extragroasă  | 0,50         | Etra-rapidă       |
| 54                | 0,17         | Rapidă            |
| 540               | 0,15         | Mijlocie          |
| 541               | 0,16         | Rapidă            |

Faza mobilă reprezentată de solventul neapos se deplasează prin pori de-a lungul suportului. În timpul acestei deplasări are loc o continuă redistribuire a substanțelor din amestec între cele două faze lichide.

$$\text{Raportul } \frac{\text{distanța străbătută de substanță}}{\text{distanța străbătută de solvent}} = R_f$$

Dintre două substanțe cu  $R_f$  diferit cea cu  $R_f$  mai mare va avea și viteză de deplasare mai mare și deci va fi găsită mai departe de strat.

Cromatografia de partiție poate fi descendentă, ascendentă și circulară. Dintre acestea cea mai folosită este cromatografia descendentă.



## CROMATOGRAFIA DESCENDENTĂ

Metoda cromatografiei descendente se realizează într-o cameră cromatografică cu pereți de sticlă prevăzută cu două jgheaburi fixate în partea de sus, care conțin solvenții neapoși. Camera cromatografică este acoperită ermetic cu o placă de sticlă (fig. 5).

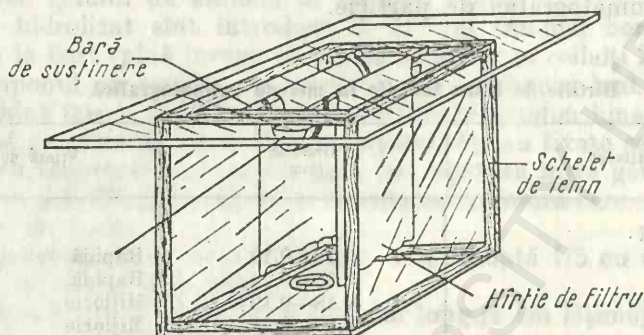


Fig. 5. — Camera cromatografică.

## SOLVENȚI

În tehnica cromatografică disolvenții organici nemiscibili cu apa sînt cei mai folosiți. Înainte de utilizare ei sînt saturați cu apă. Saturarea se efectuează prin agitarea anumitor cantități de solvent cu apă într-o pilnie de separare. Amestecul se lasă într-o pilnie de separare în repaus 1—2 ore, timp în care se formează două straturi net diferențiate: 1) stratul care conține solventul saturat cu apă și 2) stratul apos, utilizat la saturarea cu vaporii a camerei cromatografice.

Solvenților utilizați în cromatografie li se impun următoarele condiții: nu trebuie să denatureze substanța de cercetat și nu trebuie să reacționeze cu substanțele de identificare, trebuie însă să separe două sau mai multe substanțe cu structură asemănătoare. Diferența între  $R_f$  trebuie să fie de cel puțin 0,05 cm.

## REVELATORII

Revelatorii sînt reactivi care dau în general reacție de culoare și sînt specifici substanțelor de analizat.

### Revelatori pentru aminoacizi

Soluția de 1% ninhidrină este revelatorul cel mai folosit și este comun pentru aminoacizi, peptide, proteine și amine primare. Colorația variază de la albastru la portocaliu în funcție de natura aminoacizilor. Soluția de pulverizat se face de obicei 0,1—0,3% ninhidrină în butanol, alcool 96° sau acetonă. La soluția 0,3% ninhidrină în alcool 96° se poate adăuga 2% cloroform, pentru obținerea de nuanțe diferite ale spoturilor cromatografice.

Ca substanță, ninhidrina se prezintă sub formă de cristale de culoare galben pai și are proprietatea de a se dizolva perfect în alcool.

În caz contrariu ninhidrina se purifică în felul următor: 10 g ninhidrină sînt dizolvate în 50 ml HCl 2N. Se încălzește pînă la fierbere, iar partea ne-

dizolvată se separă prin filtrare. Lichidului filtrat i se adaugă 1 g de cărbune activ. Se fierbe și se agită timp de 10 minute apoi se filtrează la cald. Cărbunele din pilnie se spală de 3 ori cu HCl 2 N pentru a se înlătura pierderile de ninhidrină, iar filtratul total se usucă la vid pe KOH. Cristalele formate se păstrează la întuneric.

După pulverizare cromatograma se usucă la 105°. Ninhidrina dă spoturi colorate în albastru-violet cu majoritatea aminoacizilor; cu prolina-oxiprolină dă spoturi colorate în galben, iar deseori aceste spoturi sînt acoperite de spoturile albastru-violet. Pentru acești aminoacizi se folosesc revelatori speciali.

Prolina și oxiprolina se pun în evidență cu un preparat obținut prin dizolvarea a 0,2 g izatină în 96 ml butanol + 4 ml acid acetic glacial. Oxiprolina și prolina dau spoturi galbene.

Triptofanul se pune în evidență cu reactivul Ehrlich, preparat prin dizolvarea a 0,5 g p-dimetilaminobenzaldehidă în 99 ml alcool 96°, la care se adaugă 1 ml NCl concentrat.

Pentru intensificarea spoturilor, după uscare la etuvă, cromatograma se ține 3 ore în atmosferă cu vapori de HCl.

Triptofanul, în aceste condiții, dă spoturi albastre.

Determinările cantitative ale aminoacizilor se efectuează cu reactivul ninhidrină-clorură de cadmiu.

*Prepararea reactivului:* 0,1 g clorură de cadmiu se dizolvă în 6 ml apă și 0,3 ml acid acetic concentrat, se adaugă 2 g ninhidrină în 94 ml acetonă.

#### Revelatori pentru glucide

1. Metoda cu nitrat de argint amoniacal constă în pulverizarea cromatogramei cu un amestec preparat extemporaneu din  $\text{AgNO}_3$  N/10 +  $\text{NH}_4\text{OH}$  5N (volume egale).

Spoturile obținute sînt de culoare neagră. Reactivul nu este specific deoarece dă reacții similare și cu fenolii.

2. Soluția de monoanilină a acidului ftalic este reactivul specific glucidelor. Reactivul se prepară prin dizolvarea a 3,3 g acid ftalic + 2 ml anilină + + 95 ml acetonă + 5 ml apă distilată.

Spoturile sînt colorate în nuanță de roșu-violaceu.

3. Revelatori specifici aldolazelor: oxalat de anilină, preparat din acid oxalic-anilină; acidul oxalic este dizolvat în acetonă sau butanol. Uscarea cromatogramei pulverizate se efectuează la temperaturi pînă la 80°.

4. Revelatori specifici cetozelor. Naftorezorcinolul în mediul acid se prepară prin amestecul de volume egale al unei soluții 0,2% naftorezorcinol în alcool 96%, cu o soluție de 2% acid tricloracetic.

În determinările cantitative ale zaharurilor se folosește ca reactiv 2% clorură de trifeniltetrazoliu în soluție de NaOH 0,5% în alcool metilic. Cu acest reactiv cromatograma se umețează în întregime și se lasă timp de 60 de minute la 65°. Apoi petele sînt decupate și eluate într-o soluție de 20% acid acetic în alcool metilic. În aceste condiții colorația soluției se menține timp de 14 zile. Extincția se măsoară la fotocolorimetru sau spectrofotometru Beckmann la  $\lambda = 482 \mu\text{m}$ .

*Modul de lucru:* pregătirea probelor de analizat: o serie de substanțe ca proteinele, lipidele, hidrații de carbon, sărurile și ureea, pot uneori împiedica desfășurarea normală a cromatogramelor.



În aceste cazuri este necesară îndepărtarea lor prin diverse procedee: astfel proteinele se îndepărtează prin precipitare (deproteinizare), lipidele prin extracții cu solvenți organici, sărurile și hidrații de carbon prin absorbție pe schimbători de ioni.

Soluției de analizat i se cere un anumit grad de puritate și o anumită concentrație, concentrația optimă fiind în jurul a 1—5%.

În studiul compoziției chimice a macromoleculelor, cromatografia a permis realizarea unui progres însemnat. Macromoleculele sînt desfăcute în componentele lor moleculare prin procesul de hidroliză.

Hidroliza se efectuează de obicei cu HCl 6N sau NaOH 6N în tub închis prin fierbere la 105° sau cu refrigerent ascendent timp de 24 de ore.

Pentru zaharuri hidroliza este de 6 ore cu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6N; neutralizarea în acest caz se efectuează cu bariu în prezența indicatorului roșu neutru, iar sulfatul de bariu format se îndepărtează prin centrifugare.

În cazul cînd hidroliza se efectuează cu HCl, aceasta se îndepărtează prin evaporare la sec în vid sau pe baia de apă. Stratul subțire de clorhidrați format se reia în apă caldă sau alcool izopropilic 10%. Alcoolul izopropilic constituie un bun mijloc de conservare.

Prin hidroliza acidă (HCl) a extractelor tricloracetice se formează clorformul, produs care se poate elimina foarte repede prin încălzire la 25°.

Aplicarea „probelor de analizat” pe hîrtia de filtru se execută cu o micropipetă efilată la vîrf. Capătul pipetei se șterge bine cu o hîrtie curată și prin atingerea hîrtiei cu pipeta, soluția de analizat este depusă în locurile fixate cu creion negru. În tehnica cromatografiei descendente linia de strat se face la 5 cm de la capătul superior al hîrtiei cromatografice. Distanța dintre pete trebuie să fie de circa 2,5 cm.

Pentru obținerea rezultatelor bune se depune pe hîrtia de filtru cantitatea de 0,01 ml soluție de cercetat într-o formă circulară cu  $\varnothing = 10$  mm. În cazul utilizării unei cantități mai mari sau a unei soluții foarte diluate, soluția de cercetat se aplică în același loc în mai multe etape, lăsîndu-se în prealabil să se usuce pata precedentă.

Pentru ca petele să fie net diferențiate, să nu fie difuze și șterse este necesar ca aplicarea soluției de analizat să se facă în condițiile descrise mai sus.

Se întîmplă uneori ca petele foarte mici să nu dea rezultate bune, deoarece concentrația mare de substanțe împiedică scurtarea uniformă a solventului la nivelul zonei în care s-a aplicat soluția de cercetat.

După aplicarea și uscarea lichidului de analizat hîrtia de filtru se introduce cu capătul superior în jgheab și se fixează cu baghete de sticlă. Linia cu probele de analizat trebuie să fie la o distanță de 2 cm după bagheta de susținere. Apoi jgheabul se umple cu lichidul de irigare specific probelor de analizat și se lasă la irigat timp de 24—120 de ore. În tot acest interval de timp temperatura trebuie să fie constantă și atmosfera saturată cu vaporii lichidului de irigare.

Hîrțile de filtru după ce sînt irigate, sînt scoase din cutia cromatografică, uscate la temperatura camerei sau la etuvă (90—100°). Pentru identificare, cromatograma uscată este apoi pulverizată cu reactivul adecvat probelor de analizat metoda identificării directe. În cursul uscării la etuvă — etapa ce urmează după umectare — apar petele colorate pe fondul alb al hîrtiei.



Identificarea spoturilor apărute se face comparativ cu o cromatogramă pe care s-au aplicat substanțe-etalon cunoscute. Prin acest procedeu de comparație se stabilesc valorile „Rf” caracteristice fiecărei componente.

Pentru reproductibilitatea Rf trebuie respectate următoarele condiții:

1. menținerea unei temperaturi constante (temperatura laboratorului);
2. etanșeitatea perfectă a vasului;
3. saturarea mediului din camera cromatografică cu vapori ai solventului respectiv;
4. respectarea condițiilor descrise la aplicarea substanțelor, la uscarea și identificarea spoturilor;
5. puritatea și concentrația substanței de analizat;
6. distanța între frontul solventului și linia de start se impune să fie de cel puțin 20—25 cm iar durata de irigare minimum 24 de ore.

Pentru determinarea spoturilor cromatografice, în afară de metoda identificării directe se pot folosi metode chimice și fizico-chimice. Studiarea cromatogramelor în lumină ultravioletă constituie deseori un bun mijloc de identificare.

Aparatul cromatografic poate fi așezat într-un loc fără mari variații de temperatură, chiar în laborator, însă pentru executarea cromatogramelor în serie este necesară o cameră specială, pentru a evita atât variațiile de temperatură, cât și atmosfera toxică provocată de solvenții utilizați în cromatografie.

## APLICAREA CROMATOGRAFIEI DESCENDENTE ÎN PRACTICA DE LABORATOR

Aplicarea acestei metode se face atât la sînge cit și la urină.

Pentru identificarea aminoacizilor sau a zaharurilor în aceste probe se recurge la operațiile de defecare și concentrare.

În cazul singelui total sau al elementelor figurate din sînge, izolate prin anumite metode, se impune în prealabil o liză totală apoi se prelucrează lizatul în același fel ca și serul.

**Sînge.** La 1 ml ser sau sînge se adaugă 1 ml apă, iar diluția obținută se precipită cu 18 ml alcool etilic. Precipitatul se separă prin centrifugare. Supernatantul se tratează cu 25 ml cloroform. Prin agitare intensă se separă 2 straturi. Stratul apos se evaporă pînă la uscare. Reziduul se reia într-o cantitate foarte mică cu alcool izopropilic 10%.

Cu serul astfel tratat se pun în evidență aminoacizii liberi. Pentru punerea în evidență a aminoacizilor totali serul este supus hidrolizei acide (HCl 6N) timp de 24 de ore.

**Urină.** Urina fiind săracă în unii aminoacizi se impune a se lucra cu o cantitate de soluție mai mare. Pentru îndepărtarea serurilor se folosesc rășini schimbătoare de ioni. În acest caz se pun în evidență numai aminoacizii liberi.

**Modul de lucru:** pe fișia de hîrtie de filtru, cu lățime de 4 cm și lungime de 20—50 cm se aplică, la distanță de 6 cm de la capătul hîrtiei, cîte 0,01 ml din soluția de analizat, cu ajutorul unei micropipete. Pentru a obține rezultate bune se recomandă să se depună cantitatea de 0,01 ml soluție într-o pată circulară mică. După uscarea spoturilor hîrtia de filtru se introduce cu capătul superior în jgheabul de sticlă ce conține lichidul de irigare (soluție

saturată butanol-acid acetic-apă: 50:10:40 sau fenol-apă 1:1). Se fixează hîrtia cu bagheta de sticlă, pentru ca să nu cadă. Se lasă să irige un timp determinat, menținînd temperatura constantă și o atmosferă saturată cu vaporii lichidului de irigare. În timpul irigării, lichidul antrenează în direcție descendentă aminoacizii din soluția depusă la punctul de plecare. După 15 ore fișile de hîrtie sînt scoase din aparatul de cromatografie, uscate în etuvă (105—110°) și pulverizate pentru identificare cu lichidul de dezvoltare adecvat, de exemplu, soluție de ninhidrină 0,1% în butanol, pentru aminoacizi. În cursul uscării la etuvă, etapă care urmează dezvoltării, apar petele colorate caracteristice pe fondul alb al hîrtiei, pete roz-violet la aminoacizi.

Identificarea spoturilor apărute se face comparativ cu cromatograma, pe care s-au aplicat aminoacizii cunoscuți. Modul de lucru este identic ca pentru probă. Prin acest procedeu de comparație se pot identifica componentele soluțiilor de cercetat. Pentru a avea 10—15 aminoacizi martori, determinați în aceleași condiții, cromatograma se poate efectua pe coli late de hîrtie de filtru (20—40 cm). În acest caz se pot pune atît soluțiile de cercetat cit și soluțiile etalon pe o singură hîrtie. Operațiile sînt aceleași de la cromatograma efectuată pe o hîrtie de filtru lată de 4 cm.

Cromatografia de tipul celei descrise, efectuată într-o singură direcție, numită cromatografia „unidimensională” este completată de cromatografia „bidimensională”, în care caz se utilizează două lichide de migrare și o cantitate dublă de analizat față de cromatografia unidimensională.

## CROMATOGRAFIA DE ABSORBȚIE (CROMATOGRAFIA PE SCHIMBĂTORI DE IONI)

Principiul cromatografiei de absorbție constă în stabilirea multiplelor legături electrostatice între sarcinile electrice ale macromoleculelor și sarcinile opuse ale suprafeței schimbătorilor. Un schimb reversibil de ioni are loc între faza solidă și lichidă fără ca în structura fazei solide să apară schimbări esențiale.

Faza solidă este reprezentată de particule de rășină cu o rețea tridimensională de hidrocarbură pe care sînt grefate un număr mare de grupe ionizabile (grupări active).

În funcție de suportul macromolecular pe care sînt grefate grupările active, schimbătorii de ioni se împart în mai multe categorii:

1) schimbători de ioni pe bază de polistiren sau acid polimetacrilic (rășini schimbătoare de ioni);

2) schimbători de ioni pe bază de dextran (Sephadex);

3) schimbători de ioni pe bază de celuloze (Celux).

Capacitatea de încărcare a schimbătorilor de ioni tip Sephadex sau celulozici este de 10 ori mai mare în comparație cu schimbătorii tip polistiren (rășini).

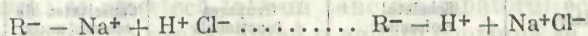
Cromatografia prin schimb ionic, a luat amploare odată cu obținerea rășinilor sintetice drept schimbători de ioni, care după comportarea lor în procesele de schimb ionic, se împart în două categorii:



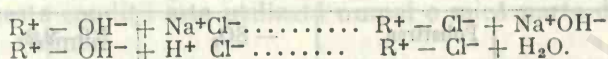
A. *cationiți* cu proprietăți acide (schimbători de cationi). Schimbul de ioni se face astfel:



În acest caz rășina este regenerată cu soluții de acizi după schema:



B. *anioniți* cu proprietăți bazice (schimbători de anioni). Schimbul se face astfel:



În acest caz rășina este regenerată cu soluții de bază, după schema:



Practic distingem 4 tipuri de schimbători, după natura chimică a grupelor ionizabile, grefate pe rețeaua hidrocarbonată a particulei de rășină:

- 1) Rășini puternic acide — au grefată gruparea ( $HSO_3^-$ )
- 2) Rășini slab acide — au grefate grupările ( $-COOH$ ) și ( $-C_6H_5-OH$ ).
- 3) Rășini puternic bazice — au grefate grupările:  
 $[-H^+(CH_3)_3]$ ;  $[-N^+(CH_3)_2(CH_2C_6H_5)]$  și  $[-N^+(CH_3)(CH_2C_6H_5)]$ .
- 4) Rășini slab bazice — au grefate grupările ( $-NH_2$ ); ( $-NH$ ) și ( $-N$ ).

În prospectul ce însoțește produsul sînt date caracteristicile fizico-chimice ale rășinilor schimbătoare de ioni ca: dimensiunile particulelor, gradul de umflare, porozitate, selectivitate, capacitate de schimb (numărul de grupări active/g schimbător), capacitate maximă, tăria acidă sau bazică, granulație. Granulația se poate exprima în mesh sau în  $m\mu$  iar formula de transformare între mesh și  $m\mu$  este următoarea:

$$\text{diametrul în m} \propto \frac{16}{\text{mesh}}$$

| $m\mu$ |       | mesh |
|--------|-------|------|
| 1,168  | ..... | 16   |
| 0,840  | ..... | 20   |
| 0,297  | ..... | 50   |
| 0,147  | ..... | 100  |
| 0,074  | ..... | 200  |
| 0,038  | ..... | 400  |

În general schimbătorul de ioni, într-o primă fază, selectează dintr-un amestec anumite substanțe cu încărcătură electrică opusă tipului său de grupări. Eluția substanțelor legată de schimbătorul de ioni are loc prin desfacerea legăturilor dintre acestea și schimbător, cu ajutorul unor soluții tampon ai căror ioni au afinitate mai mare pentru grupările ionice ale schimbătorului. Volumul de eluție pentru fiecare tip de substanță este o constantă determinată de: tipul schimbătorului, înălțimea coloanei de schimbători, pH și molaritatea tamponului de eluție.

#### SCHIMBĂTORI DE IONI PE BAZĂ DE POLISTIREN

Cei mai folosiți schimbători de ioni pe bază de polistiren sînt: Dowex—50( $X_2$ ,  $X_4$ ), Dowex —2 ( $X_{10}$ ,  $X_8$ ,  $X_4$ ), Amberlit IRC—50 (XE—64), Amberlit IRA—400.



Schimbători de ioni pe bază de polistiren

| Tipul de schimbători       | Scheletul moleculei  | Gruparea funcțională                                                                 | Capacitatea de schimb (m.p./g) | Diametrul granulei uscate (m.p.)      |
|----------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Cationiți                  |                      |                                                                                      |                                |                                       |
| Dowex —50(X <sub>2</sub> ) | Polistiren           | — SO <sub>3</sub>                                                                    | 5,0—9,2                        | 50—100<br>100—200                     |
| Dowex —50(X <sub>4</sub> ) | Polistiren           | — SO <sub>3</sub>                                                                    | 5,0—9,2                        | 200—400<br>20—50<br>50—100<br>100—200 |
| Amberlit IRC-50(XE-64)     | Acid polimeta-crilic | — COO                                                                                | 10,0                           | 0—400<br>20—400                       |
| Anioniți                   |                      |                                                                                      |                                |                                       |
| Dowex —2(X 10)             | Polistiren           | —N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH | 3,0—3,2                        | 50—100<br>100—200<br>200—400          |
| Dowex —2(X <sub>8</sub> )  | Polistiren           | —N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH | 3,0—3,2                        | 20—50<br>50—100<br>100—200<br>200—400 |
| Dowex —2(X <sub>4</sub> )  | Polistiren           | —N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> OH | 3,0—3,2                        | 20—50                                 |
| Amberlit IRA-400           | Polistiren           | —N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>                                      | 2,5                            | 200—400                               |

Acești schimbători sint folosiți în metoda batch, metoda coloanei și metoda rășinei mobile.

Indiferent de metodă, schimbătorii de ioni pe bază de polistiren sint hidratați și activați.

PRELUCRAREA SCHIMBĂTORILOR PE BAZĂ DE POLISTIREN

1. **Hidratarea** — se face prin tratarea rășinii de 4—5 ori cu apă distilată folosind operația de decantare după sedimentarea schimbătorului. Prin acest proces se îndepărtează și particulele fine, iar ultima decantare se face prin tr-o pîlnie Büchner.

2) **Activarea schimbătorului** — schimbătorul hidratat este activat prin-punerea în echilibru cu ionii lui contrari sau folosind procedee severe, de exem-plu:

— Schimbătorul hidratat se suspendă în soluție alcalină (NaOH4N) și apoi se filtrează prin pîlnie Büchner, urmînd spălarea cu apă pînă la reacția neutră a filtratului. Sarea de sodiu a rășinei este convertită în formă acidă prin tratare cu HCl4N. Excesul de acid se elimină prin spălări repetate cu apă pînă cînd pH-ul suspensiei devine neutru și apoi se suspendă în tampon de lucru. Pentru obținerea unor rezultate reproductibile este necesar să se stabilească un echilibru între schimbător și tamponul folosit în lucru.

3. Conservarea schimbătorului se face în tampon la  $+4^{\circ}$  timp îndelungat în prezență de merthiolat 1‰ sau azidă de sodiu 0,1% pentru a nu se infecta.

*Metoda rășinii mobile* constă în faptul că atât schimbătorul de ioni, soluția de tratat cit și regeneratorul sînt amestecate permanent. Metoda necesită instalații speciale și este utilizată numai pentru scopuri industriale.

*Metoda batch:* se amestecă într-un tanc schimbătorul echilibrat în tamponul de lucru cu soluția probă. După o agitare continuă se filtrează, iar filtratul reprezintă proba. Rășina separată este regenerată pentru un nou ciclu operator. Procedul este rapid și ușor de executat, însă mai puțin eficient, deoarece în aceste condiții este utilizată numai o mică parte din capacitatea de schimb a rășinei.

*Metoda coloanei* — coloanele sînt livrate de firmele comerciale sau se pot confecționa în laborator. Coloana cromatografică este un tub de sticlă prevăzut cu un strat suport la partea inferioară.

Suportul este permeabil pentru a permite lichidului să treacă. Schimbătorul echilibrat în tamponul de lucru este introdus în coloana cromatografică evitîndu-se bulele de aer.

La capătul inferior al coloanei schimbătorul se sprijină pe un filtru din vată de sticlă sau din perle de sticlă cu diametrul foarte mic.

După aplicarea probei de cromatografiat exact la suprafața superioară a schimbătorului ionic coloana se deschide, proba pătrunde în schimbător și apoi coloana se închide. În continuare se face legătura coloanei cu vasul în care se află soluția eluantă. Deoarece prin modificarea forței ionice sau a pH-ului se realizează eluarea, coloana se deschide, proba este lăsată să curgă de-a lungul schimbătorului de ioni antrenată de soluția eluantă.

Volumul de eluție pentru fiecare tip de substanță este o constantă determinantă de tipul schimbătorului, înălțimea coloanei de schimbători, pH și molaritatea tamponului de eluție.

Metoda coloanei are o mare eficiență fiind utilizată aproape întreaga capacitate de schimb a rășinei.

*Colectarea fracțiunilor* se face în tuburi la volum constant.

Etapile care trebuie parcurse în cromatografia pe schimbători de ioni sînt:

- alegerea și pregătirea schimbătorului;
- alegerea tamponului;
- pregătirea coloanei;
- aplicarea probei;
- eluția probei;
- regenerarea schimbătorului;
- conservarea schimbătorului.

#### FOLOSIREA SCHIMBĂTORILOR DE IONI PE BAZĂ DE POLISTIREN ÎN LABORATORUL CLINIC

Folosirea acestora constă în demineralizarea apei de robinet și a lichidelor biologice (lichid cefalorahidian, urină, suc gastric), lichide care după demineralizare pot fi supuse separărilor de proteine prin electroforeză sau cromatografie pe hirtie.



## SCHIMBĂTORI DE IONI PE BAZĂ DE DEXTRAN (SEPHADEX)

Schimbătorii de ioni tip Sephadex au la bază dextranul, polizaharid al glucozei. Acești schimbători de ioni sînt insolubili în soluții slab alcaline și acide. În soluții puternic acide și mai ales la cald are loc hidroliza legăturilor glucozidice. Printre cei mai folosiți schimbători de ioni tip Sephadex se numără: DEAE Sephadex, QAE ca anioniți, iar CM Sephadex, SP Sephadex și SE sînt cationiți.

În tabelul LXIV sînt date caracteristicile acestor schimbători de ioni pe bază de Sephadex.

Tabelul LXIV

Caracteristicile schimbătorilor de ioni pe bază de dextran

| Tip de schimbător                                   | Caracter                          | Grupare funcțională                      | Ionul de schimb | Ø granule uscate (mμ) |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|-----------------|-----------------------|
| DEAE-Sephadex<br>Dietil-amino-etil<br>A-25<br>A-50  | Schimbător anionic slab bazic     | $C_2H_4N^+ (C_2H_5)_2$                   | $Cl^-$          | 40—120                |
| QAE-Sephadex<br>Dietil (2 hidroxi-propil) aminoetil | Schimbător anionic puternic bazic | $C_2H_4N (C_2H_5)_2 - CH_2 - CH(OH)CH_3$ | $Cl^-$          | 40—120                |
| SE-Sephadex sulfo-etil<br>C-25<br>C-50              | Schimbător cationic puternic acid | $C_2H_4SO_3^-$                           | $Na^+$          | 40—120                |
| CM-Sephadex<br>Carboximetil<br>C-25<br>C-50         | Schimbător cationic slab acid     | $CH_2CO^-$                               | $Na^+$          | 40—120                |
| SP-Sephadex<br>Sulfo-propil<br>C-25<br>C-50         | Schimbător cationic puternic acid | $C_3H_6SO_3^-$                           | $Na^+$          | 40—120                |

Alegerea corectă a schimbătorilor de ioni care să posedă anumite grupări active, depinde de sarcina substanțelor de cromatografiat. Substanțele sînt legate de schimbător, cînd sarcinile lor sînt de semn contrar — legarea este electrostatică și reversibilă. De asemenea alegerea acestora este în funcție și de greutatea moleculară a proteinelor așa cum se arată în tabelul LXV.

Tabelul LXV

Folosirea schimbătorilor de ioni în funcție de greutatea moleculară

| Greutatea moleculară a proteinelor | Tip schimbător                   |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Gr. mol. mici < 30 000             | A <sub>25</sub> —C <sub>25</sub> |
| Gr. mol. medii 30 000—200 000      | A <sub>50</sub> —C <sub>50</sub> |
| Gr. mol. mari > 200 000            | A <sub>25</sub> —C <sub>25</sub> |



Acești schimbători sînt folosiți în metoda batch și metoda coloanei. Indiferent de metodă schimbătorul de ioni pe bază de dextran trebuie să fie hidratat și echilibrat în tamponul de lucru.

Alegerea tamponului și a pH-ului se face în funcție de schimbători. Tamponele cationice se folosesc pentru schimbători anionici, iar tamponele anionice se folosesc pentru schimbători cationici; pH-ul tamponului se alege astfel ca substanțele să aibă o sarcină netă opusă celeia a schimbătorului. Tamponul ales trebuie să aibă un pH și o putere ionică compatibile cu stabilitatea probei cercetate și cu zona de eficiență a schimbătorului.

Cele mai folosite tampone în cromatografie sînt tamponul fosfat pentru pH-uri în jurul neutralității (6—8), tamponul TRIS pentru pH-uri în jurul lui 8 și tamponul acetat pentru pH-urile acide în jur de 5.

Hidratarea se face în soluții slab saline la temperatura camerei sau în baie de apă conform celor expuse mai sus.

Durata de îmbibare care este în funcție de tipul de Sephadex este dată în tabelul LXVI.

Tabelul LXVI

Durata de îmbibare a Sephadexului

| Tipul de Sephadex    | Timpul minim de îmbibare la |                |
|----------------------|-----------------------------|----------------|
|                      | temperatura camerei         | pe baie de apă |
| G-10; G-15; G-25     |                             |                |
| G-50                 | 3 ore                       | 1 oră          |
| G-75                 | 24 ore                      | 3 ore          |
| G-100; G-150; G-200; | 3 zile                      | 5 ore          |
| LH-20                | 3 ore                       | —              |

Deoarece legarea de schimbător se face în anumite condiții de pH și forță ionică, eliberarea sa de pe schimbător are loc prin variația acestor parametri.

În acest scop, coloana se conectează la vasul cu soluție eluentă și proba este lăsată să curgă de-a lungul coloanei care este antrenată de soluția eluentă, iar fracțiunile sînt colectate în tuburi.

Schimbătorul de ioni Sephadex poate fi eluat cu soluții de tampon în gradient de pH sau forță ionică, continuu sau în trepte.

*Eluția în trepte* sau în gradient discontinuu se realizează prin trecerea succesivă peste schimbătorul de ioni a unor soluții tampon cu pH și putere ionică diferită.

Combinațiile folosite sînt următoarele:

a) tampon cu putere ionică din ce în ce mai mare iar pH-ul din ce în ce mai mic;

b) tampon cu putere ionică și pH din ce în ce mai mare;

c) tampon cu pH-ul constant dar cu forță ionică în creștere sau cu pH-ul în creștere și forță ionică constantă.

*Eluția în gradient continuu* se realizează cu ajutorul unei instalații speciale prin trecerea peste schimbătorul de ioni a unei soluții tampon a cărei forță ionică este crescută continuu, iar pH-ul se menține constant sau se scade.

Puterea de rezoluție a separărilor în eluția continuă este mai mare decît în cea discontinuă.

## Colectarea fracțiunilor

Fracțiunile sînt colectate în tuburi la volum constant, manual sau automat.

Viteza de scurgere a eluentului depinde în mare măsură de dimensiunile particulelor schimbătorilor.

Dimensiunile de 40—200 mesh sînt folosite pentru scurgeri rapide. Dimensiuni de 200—400 mesh sînt folosite pentru scurgeri lente.

Debitul de scurgere a eluentului în afară de dimensiunile schimbătorului depinde de mai mulți factori ca: diametrul și lungimea coloanei încărcată cu schimbător, compoziția tamponului și presiunea aplicată.

Regenerarea schimbătorului de ioni tip Sephadex, se face prin spălare cu soluție salină de concentrații crescînde.

După spălare și regenerare, schimbătorul se reechilibrează cu tamponul de pornire și poate în aceste condiții să fie conservat timp îndelungat, în prezența unui agent antimicrobian: azida de sodiu 0,1% sau merthiolat 1‰.

## FOLOSIREA SCHIMBĂTORILOR DE IONI PE BAZĂ DE DEXTRAN ÎN LABORATORUL CLINIC

Cromatografia pe schimbători de ioni tip Sephadex se folosește pentru separarea (scop analitic) și identificarea (scop preparativ) a substanțelor biologice labile.

Separarea proteinelor (plasmatică, suc gastric, LCR) se face azi curent în laboratorul clinic folosind schimbător de ioni tip Sephadex. Ca exemplu se dă tehnica de separare a proteinei serice.

Pe coloana cromatografică de 10/1 cm încărcată cu 0,1 g — 1 g DEAE Sephadex A50 se pot fracționa 2 ml ser uman. Serul în prealabil trebuie să fie dializat față de soluția tampon folosită la echilibrarea coloanei (tampon fosfat pH 6,6  $\mu$ /0,02).

Eluarea se face cu același tampon fosfat pH 6,6 cu concentrații crescînde de NaCl conform fig. 6. Colectarea fracțiunilor poate fi efectuată manual sau automat, în tuburi volum 5 ml.

Prezența sau absența proteinei se controlează cu o soluție de 1% acid sulfosalicilic sau cu acid azotic concentrat.

Fig. 6 reprezintă curba fracționării proteinelor serice obținută în aceste condiții.

Determinarea cantitativă a fracțiunilor proteice se face cu metoda Lowry sau prin absorbția specifică în ultraviolete ( $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ ).

Pentru obținerea celor mai bune separări de proteine este folosită proporția 1 g schimbători de ioni Sephadex/0,1 g proteine.

În continuare se dă un alt exemplu de separare pentru diferite tipuri

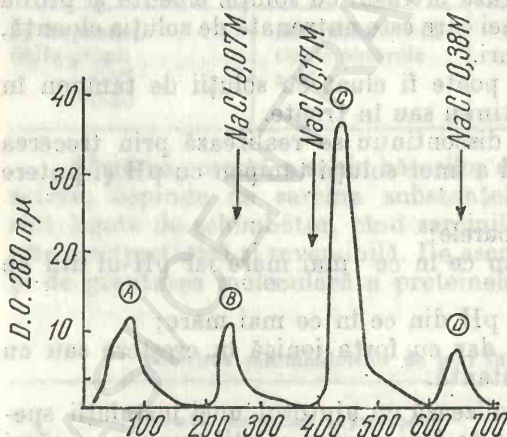


Fig. 6. — Fracționarea proteinelor serice pe o coloană de Dextran.

- A = fracțiunea gamaglobulinei
- B = fracțiunea betaglobulinei
- C = fracțiunea albuminei
- D = fracțiunea alfa<sub>2</sub>globulinei



de hemoglobină, schimbătorul de ioni fiind CM Sephadex C<sub>50</sub>. Folosindu-se o coloană de dimensiunile: 0,9/60 cm, eluant tampon TRIS—ac. maleic pH=6,5—8 și rata de 20 ml/oră s-a obținut separarea a 5 tipuri de hemoglobine: F,A,A<sub>2</sub>, S și C, dintr-un amestec de hemoglobine realizat în laborator.

### SCHIMBĂTORII DE IONI PE BAZĂ DE CELULOZĂ

Schimbătorii de ioni pe bază de celuloză, sînt cei care conțin grupări OH libere, derivați din polimerul natural celuloză, cu proprietăți slabe de schimb ionic. Pentru mărirea capacității de schimb se grează pe suportul macromolecular al celulozei diferite grupări active.

Cei mai folosiți schimbători de ioni din această grupă sînt: CM (carboximetil), SE (sulfoetil), cationiți, celulozici iar DEAE (dietil-aminoetil), ECTEO LA celuloză ca anioniți, comercial se numesc Cellex.

În tabelul LXVII sînt date caracteristicile unor schimbători pe bază de celuloză.

Tabelul LXVII

Caracteristicile unor schimbători de ioni pe bază de celuloză

| Tip de schimbător                                  | Schelet  | Caracter                          | Grupare funcțională                     | Ionul de schimb | Ø granule uscate m |
|----------------------------------------------------|----------|-----------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|--------------------|
| CELLEX-DEAE(D)<br>Dietil-amino-etil                | Celuloza | Schimbător anionic puternic bazic | $C_2H_4N^+ (C_2H_5)_2$                  | Cl <sup>+</sup> | 20—400             |
| CELLEX-TEAE (T)<br>Trietil-amino-etil              | "        | Schimbător anionic puternic bazic | $C_2H_4N^+ (C_2H_5)_3$                  | Cl <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-GE<br>guamido-etil                          | "        | Schimbător anionic puternic bazic | $C_2H_4NHC(NH_2) = NH_2$                | Cl <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-ECTEO-LA(E)<br>Epiclorhidrin triclona-amino | "        | Schimbător anionic moderat bazic  | amină nedefinită                        | Cl <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-AE<br>Aminoetil                             | "        | "                                 | $C_2H_4-NH_2$                           | Cl <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-PEI<br>Polietilen imină                     | "        | "                                 | $(CH_2-CH_2-NH)_x-$<br>$CH_2-CH_2-NH_2$ | Cl <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-PAB<br>Para-amino-benzil                    | "        | Schimbător anionic slab bazic     | $CH_2-C_6H_4-NH_2$                      | Cl <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-SE<br>sulfo-etil                            | "        | Schimbător cationic puternic acid | $C_2H_4-SO_3-Na^+$                      | Na <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-P<br>Acid fosforic                          | "        | Schimbător cationic moderat acid  | $PO_3^- - Na_2^+$                       | Na <sup>+</sup> | "                  |
| CELLEX-CM<br>Carboxi metil                         | "        | Schimbător cationic slab acid     | $CH_2-COO-Na^+$                         | Na <sup>+</sup> | "                  |



*Modul practic de lucru* cu schimbătorii de ioni pe bază de celuloză este în principiu același ca cel descris la schimbătorii de ioni pe bază de dextran.

## GEL FILTRAREA

Gel filtrarea sau cromatografia de excludere moleculară constă în separarea compuşilor unui amestec prin trecerea lor printr-un strat de gel. Moleculele cu dimensiuni mari trec primele și apoi cele cu dimensiuni mici.

Pe scară largă sînt folosite gelurile pe bază de dextran cunoscute sub denumirea comercială de Sephadex.

Proprietatea gelurilor de dextran, de a exclude din soluții moleculele cu dimensiuni mari și de a fi permeabile pentru moleculele cu dimensiuni mici, formează principiul metodei de cromatografie pe coloană de gel, schematizat în fig. 7. Metoda poate fi aplicată atât soluțiilor ionizate cît și celor neionizate.

Volumul total al coloanei de gel ( $V_t$ ) =  $V_0 + V_i + V_g$

$V_0$  = volumul apei din afara particulelor de gel (void volume)

$V_i$  = volumul apei din interiorul particulelor de gel.

$V_g$  = volumul matricei gelului.

Coefficientul de distribuție ( $K_d$ ) este raportul de distribuire a soluției respective dintre apa din granulele gelului și apa extragranulară.

O substanță cu  $K_d = 0$  va fi complet exclusă din granulele gelului.

Substanța cu  $K_d$  cuprinsă între 0 și 1 va fi parțial exclusă.

Substanța cu  $K_d = 1$  va fi absorbită pe matricea gelului.

În cazul introducerii în coloana de cromatografie a două soluții, una cu  $K_d = 0$  și alta cu  $K_d = 1$ , prima va apărea în eluent după volumul  $V_0$ . După adăugarea unui volum  $V_i$  va apărea și substanța ne-exclusă, ambele păstrînd raportul concentrațiilor inițiale (fig. 7a).

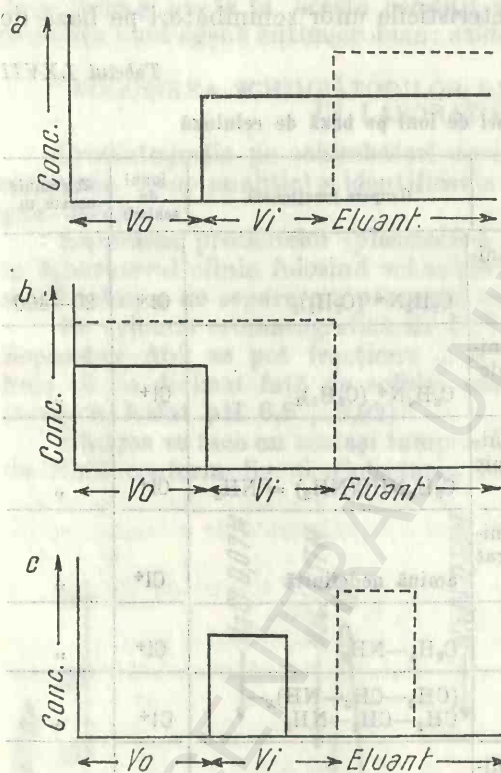


Fig. 7 — Principiul cromatografiei pe coloană de Dextran

- a) separarea a două substanțe parțial reținute pe gel;
- b) separarea a două substanțe: una complet exclusă;
- c) cealaltă parțial exclusă de pe gel;

c) separarea completă.

După volumul  $V_0$  soluția exclusă va înceta a mai apărea în eluent, iar soluția parțial exclusă va apărea după volumul  $V_0 + V_i$  (volum suplimentar) (fig. 7 b). Dacă volumul probei este mai mic decît  $V_i$  este posibilă o separare completă a soluțiilor (fig. 7 c). În caz contrar cele două substanțe nu pot fi

complet separate. Ecuația generală a apariției unei substanțe în eluant — după cromatografierea pe o coloană de gel — tip dextran — devine deci:

$$V_e = V_0 + KdV_i$$

### PROPRIETĂȚILE GELURILOR

Datorită conținutului mare în grupări — OH — a lanțului polizaharidic, Sephadexul este puternic hidrofil, se umflă bine în apă electroliții formînd un gel.

Proprietățile de umflare sau gradul de legare variază în funcție de diferențele tipuri de Sephadex. Capacitatea de umflare este caracterizată de cantitatea de apă reținută (Water regain).  $W_r$  reprezintă cantitatea de apă adsorbită de un grăunte de gel prin umflare și nu include apa dintre particule. Tipul de Sephadex se referă la valoarea „Water regain” adică  $G_{10}$  are  $W_r = 1$  ml/g gel uscat, iar  $G_{200} = 20$  ml/g gel uscat.

Valoarea pentru  $W_r$  mare înseamnă matrice mică, domeniul de fracționare deplasat spre greutatea moleculare mari, iar valoarea pentru  $W_r$  mică domeniul de fracționare este limitat la greutatea moleculare mici.

Gelul de Sephadex este stabil într-un interval larg de pH 2—9 și este de mai multe tipuri. Un același tip de Sephadex poate avea particule de diferite dimensiuni (tabelul LXVIII)

Tabelul LXVIII

#### Diferite tipuri de Sephadex

| Tipul de Sephadex | Diametrul particulelor | ml H <sub>2</sub> O reținută/g gel uscat | Volumul gelului | Domenii de fracționare a proteinelor (GM) |               |
|-------------------|------------------------|------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|---------------|
|                   |                        |                                          |                 | peptide și proteine                       | dextrani      |
| G-10              | 40—120                 | 1,0                                      | 2—3             | > 700                                     | > 700         |
| G-15              | 40—120                 | 1,5                                      | 2,5—3,5         | > 1 500                                   | > 1 500       |
| G-25 coarse       | 100—300                | 2,5                                      | 4—6             | 1 000—5 000                               | 100—5 000     |
| G-25 medium       | 50—150                 | 2,5                                      | 4—6             | 1 000—5 000                               | 100—5 000     |
| G-25 fine         | 20—80                  | 2,5                                      | 4—6             | 1 000—5 000                               | 100—5 000     |
| G-25 superfine    | 10—40                  | 2,5                                      | 4—6             | 1 000—5 000                               | 100—5 000     |
| G-50 coarse       | 100—300                | 5,0                                      | 9—11            | 1 500—30 000                              | 500—10 000    |
| G-50 medium       | 50—150                 | 5,0                                      | 9—11            | 1 500—30 000                              | 500—10 000    |
| G-50 fine         | 20—80                  | 5,0                                      | 9—11            | 1 500—30 000                              | 500—10 000    |
| G-50 superfine    | 10—40                  | 5,0                                      | 9—11            | 1 500—30 000                              | 500—10 000    |
| G-75              | 40—120                 | 7,5                                      | 12—15           | 3 000—70 000                              | 1 000—50 000  |
| G-75 superfine    | 10—40                  | 7,5                                      | 12—15           | 3 000—70 000                              | 1 000—50 000  |
| G-100             | 40—120                 | 10,0                                     | 15—20           | 4 000—150 000                             | 1 000—100 000 |
| G-100 superfine   | 10—40                  | 10,0                                     | 15—20           | 4 000—150 000                             | 1 000—100 000 |
| G-150             | 40—120                 | 15,0                                     | 20—30           | 5 000—400 000                             | 1 000—150 000 |
| G-150 superfine   | 10—40                  | 15,0                                     | 20—30           | 5 000—400 000                             | 1 000—150 000 |
| G-200             | 40—120                 | 20,0                                     | 30—40           | 5 000—800 000                             | 1 000—200 000 |
| G-200 superfine   | 10—40                  | 20,0                                     | 30—40           | 5 000—800 000                             | 1 000—200 000 |

Gelurile „superfine” sînt folosite în cromatografie pe coloană (care necesită rezoluție înaltă) și în cromatografie în strat subțire.

Gelurile „fine” sînt folosite în scopuri preparative și au viteză de curgere mică.



Gelurile „coarse“ și „medium“ sînt folosite în cromatografie preparativă unde se cere o viteză mare de curgere la o presiune de lucru scăzută. Pentru separarea substanțelor cu greutate moleculară mai mică de 5 000 se întrebuițează tipul G25, pentru cele cu greutate moleculară mai mică de 10 000 se întrebuițează G50.

La alegerea gelului trebuie să se țină seama de absorbția proteinelor pe gel sau de interacțiunile proteină-proteină care falsifică rezultatele. Aceste geluri sînt folosite în special în metoda coloanei.

## TEHNICA GEL FILTRĂRII

În primul rînd se hidratează gelul (în apă sau soluție slab salină). Hidratarea are loc în 5—24 ore la temperatura camerei sau sub 5 ore, punînd gelul într-o baie de apă la fierbere. Înainte de a folosi gelul, se recomandă îndepărtarea particulelor foarte fine care nu au sedimentat.

Apoi gelul în tamponul de lucru (suspensie groasă) este turnat în coloana cromatografică evitîndu-se bulele de aer. Pentru evitarea bulelor care constituie un mare dezavantaj la folosirea coloanei se impune ca gelul în momentul turnării să aibă temperatura laboratorului.

Coloana cromatografică folosită în tehnica gel filtrării se compune dintr-un tub de sticlă (de diferite dimensiuni) care poate fi prevăzut la capăt cu un robinet. În partea inferioară a coloanei gelul se sprijină pe un filtru de vată de sticlă sau un filtru nylon. Raportul între înălțime și diametru este de 10/1 și 20/1. După umplerea coloanei se face imediat legătura cu rezervorul în care este eluentul. O echilibrare perfectă se face cu un volum de eluent de 2—3 ori volumul total al coloanei — ultimul strat de gel trebuie să fie perfect orizontal. Eluția trebuie efectuată sub o presiune constantă care depinde de distanța dintre suprafața eluentului din rezervor și punctul de colectare al probei. În cazuri speciale se poate folosi și o presiune mai ridicată care se realizează cu ajutorul unei bombe de azot.

Pentru a determina  $V_0$  și omogenitatea coloanei se folosește soluția de „blue dextran“ (albastru de dextran) concentrație 2 mg/ml. Acest colorant are greutatea moleculară  $2 \times 10^6$  și este complet exclus din coloană prin eluție.

Coloanele sînt livrate de firme comerciale sau se pot confecționa în laborator.

Aplicarea probei de cercetat se face prin trei metode:

- 1) Pe suprafața uscată (suprafața gelului fiind protejată de o hîrtie de filtru sau plasă nylon).
- 2) Sub eluent în care proba trebuie să fie mai densă decît elementul (aceasta se realizează cu sucroză în concentrație finală de 1%).
- 3) Cu adaptor special.

După aplicarea probei, coloana se deschide, proba pătrunde în gel iar apoi coloana este închisă din nou, se conectează la vasul cu eluent și se deschide pentru eluție.

Proba este lăsată să curgă de-a lungul coloanei, fiind antrenată de soluția eluentă. Colectarea fracțiunii se face în tuburi la volum constant, manual sau automat, iar determinările cantitative și calitative se fac prin metode chimice sau fizico-chimice.

Viteza de curgere este invers proporțională cu înălțimea coloanei dacă presiunea este constantă. Ea variază în funcție de tipul de gel. Gelurile cu



particule mici, determină o viteză de curgere mai mică, dar o putere de rezoluție mai mare, iar gelurile cu particule mari determină o viteză de curgere mare și este necesară o reglare a vitezei de curgere.

O trăsătură caracteristică a „gel filtrării“ este aceea că toate substanțele din probă sint eluate fără schimbarea eluentului.

#### Regenerarea coloanei

Se face prin spălări repetate cu soluția tampon iar conservarea se face tot în soluție tampon la care se adaugă azidă de Na, cloroform. Sterilizarea se face la 120°C timp de 30'.

#### Folosirea gelului de Sephadex în laboratorul clinic

Gelul de Sephadex se folosește la separarea proteinelor serice precum și pentru desalifiere (operație care se face mult mai rapid decât prin dializă), la separarea și purificarea enzimelor, la separarea coloranților nefixați de conjugatele proteină-proteină.

De asemenea soluțiile care conțin compuși cu greutate moleculară mare pot fi concentrate prin tratare cu Sephadex pulbere (metoda batch), Sephadexul G-25 este cel mai des folosit în acest scop.

#### Cromatografia de afinitate

Cromatografia de afinitate este un tip nou de cromatografie de absorbție, în care separarea se bazează nu pe legarea fizico-chimică a substanțelor de schimbătorul de ioni ci pe o legare specifică, biologică a acestuia.

Materialul suport din care este alcătuită coloana cromatografică are o afinitate biologică specifică pentru substanța care este izolată prin trecere pe coloană.

La un suport insolubil (celuloză, agaroză, sticlă etc.) se atașează prin legături covalente un ligand care este de obicei unul din componenții unei reacții biochimice de tipul:

enzimă + inhibitor; antigen + anticorp; enzimă + substrat

Această legare duce la insolubilizarea ligandului (prin legarea sa de suport prin grupări care nu sint implicate în activitatea biologică specifică). Grupările ligandului esențiale pentru activitatea sa biologică specifică rămân libere și astfel se pot combina specific cu componenții corespunzători dintr-un amestec. De exemplu: un anticorp insolubilizat (imunosorbent) poate extrage dintr-un amestec numai antigenul corespunzător, inhibitorul unei enzime numai enzima sa specifică.

Una din caracteristicile principale ale liganzilor care pot fi molecule sau macromolecule cu afinitate unică în stare insolubilă pentru macromolecula biologică, este stabilitatea pe care trebuie să o aibă în tot timpul ciclului de operații al cromatografiei de afinitate.

#### TIPURI DE SUPORTURI FOLOSITE ÎN CROMATOGRAFIA DE AFINITATE (C.A.)

|            |                |                                   |
|------------|----------------|-----------------------------------|
| organice   | { polizaharide | { celuloza<br>agaroză<br>amidonul |
|            | { sintetice    | { poliacrilamida<br>polistirenul  |
| anorganice | { sticla       |                                   |

Absorbantul specific poate fi format și prin insolubilizarea ligandului ca atare prin polimerizare fără atașarea unui suport suplimentar. Așa sînt de exemplu absorbânți specifici obținuți prin polimerizare cu aldehydă glutamică după metoda lui Avrameas.

În cazul respectiv, ligandul este în același timp suport pentru cromatografia de afinitate și absorbant specific. Deși au caractere fizice mai slabe, totuși această categorie de absorbânți specifici sînt cei mai folosiți fiind foarte ușor de preparat. Aldehida glutarică produce insolubilizarea macromoleculei prin legare de grupările amino libere neparticipante la centru biologic activ.

La macromoleculele cu puține grupări amino libere nu se produce o polimerizare suficientă pentru a da un produs insolubil, motiv pentru care se practică o copolimerizare în prezența unei alte proteine, de exemplu albumina.

Cloroformiatul de etil la pH-uri apropiate de punctul izoelectric duce de asemenea la preparate insolubile. Tabelul LXIX reprezintă comparativ proprietățile celor două feluri de absorbânți specifici.

Tabelul LXIX

Proprietățile celor două feluri de absorbânți

| Agent polimerizant                                        | Cloroformiat de etil (CE)                                      | Aldehydă glutarică (AG)                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Procedeu                                                  | 0,5 ml CE/g proteină<br>pH 5,1—7,2                             | 100 mg AG/g proteină<br>pH 4,5—7,5                                                                                            |
| Greutatea particulei obținute                             | Permite folosirea CA fără centrifugare la viteză mare          | Greutatea particulei mai mare                                                                                                 |
| Capacitate                                                | 1 g atg. ins. ads.<br>300—600 mg atc omolog                    | 100 mg atg. ins. ads.<br>10—100 mg atc. omolog                                                                                |
| Capacitate de adsorbție față de aceeași proteină solubilă | 10 ori mai mică                                                | 4—5 ori mai mică                                                                                                              |
| Eluția                                                    | KI 5,5 M în tris 0,05 M, pH 8,2<br>Gly-HCl 0,2 M pH 2,2        | Mai completă: 65—98% din materialul ads. NaI 2 M—5M în Tris pH 9<br>Gly-HCl 0,1 M, pH 2,8<br>MgCl <sub>2</sub> 5M în Tris 7,5 |
| Regenerare                                                | Mai bună                                                       | După 4 cicluri o descreștere a capacității de 50%                                                                             |
| Rezistența                                                | Mai bună<br>Uree 8 M<br>Dodecilsulfat 5 %<br>NaCl 6N Hidroliză |                                                                                                                               |

De mare importanță pentru separarea polizaharizilor a fost insolubilizarea concanavalinei A cu L-leucin-N-carboxi-anhidridă.

Un alt principiu de insolubilizare a fost aplicat la obținerea derivaților insolubili, polimerizați, legați prin legături disulfidice (S—S).

Substanța absorbită specific pe absorbânți este apoi eluată cu tamponate adecvate, obținîndu-se eventual printr-o singură etapă un produs cu puritate 100%.



Tampoanele sînt acide cu molaritate mică de tipul glyocol-HCl și tampoane cu molaritate mare ca NaI și  $MgCl_2$  la pH-uri neutre sau alcaline. Absorbantii sînt folosiți în metoda batch și metoda coloanei.

În cromatografia de afinitate se folosesc suporturi de absorbție de tipul Sepharozei 4 B activată cu BrCN, livrați de firma „Pharmacia” (Uppsala) care pot fi cuplați cu orice ligand proteic sau concanavalină A.

Sepharoza este livrată de aceeași firmă pentru separarea zaharurilor; de asemenea pentru evitarea împiedicării sterice pot fi livrați și compuși în care grupările specifice se află legate de matricea principală prin intermediul unei ramificații.

Cromatografia de afinitate a fost aplicată cu succes la purificarea anticorpilor și antigenelor (imunosorbenti) a enzimelor, acizilor nucleici, proteinelor de transport, proteinelor care leagă vitamine sau cofactori, proteinelor receptori, structurilor receptoare de hormoni sau medicamente, zaharuri și glicoproteine, celule, virusuri și la separarea componentelor proteice denaturate rezultate prin purificare.

Avantajele acestei metode sînt evidente: rapiditatea, ușurința, posibilitatea de a separa numai materialul activ și protecția împotriva denaturării materialului respectiv luat în lucru.

Totuși metoda cromatografiei de afinitate este aplicată mai ales în scop analitic și de cercetare, randamentul fiind mai mic decît al metodelor fizico-chimice uzuale dar care în schimb nu prezintă puritate de 100%.

Imunosorbentii au fost primii adsorbenti specifici utilizați. Ei au servit la izolarea și purificarea anticorpilor din serurile imune, îndepărtarea anticorpilor neprecipitanți și identificarea lor în concentrații mici. De asemenea au fost folosiți pentru determinările cantitative de anticorpi, la demonstrarea și analiza heterogenității anticorpilor față de un același antigen sau chiar față de același determinant antigenic. S-au putut urmări schimbările în natura anticorpilor sintetizați în cursul procesului de imunizare și al distribuției lor în fracțiunile imunoglobulinice ale serului.

Cromatografia de afinitate a servit la analiza avidității anticorpilor: anticorpii cu aviditate mică sînt eluați de pe coloane mai rapid.

Un bun imunosorbent trebuie:

1. — Să fie specific, adică să adsoarbă dintr-un amestec numai Ate, Atg sau haptena omologă.

*Ligand*

*Adsorbție*

Ate ..... Atg și haptena

Haptena ..... Ate

2. — Să aibă o capacitate bună, respectiv pentru Ate, Atg, haptena.

3. — Să fie insolubil și să aibă proprietăți fizice potrivite pentru folosirea lui în procedee de coloană sau batch.

4. — Să permită eluția materialului adsorbit în mod cantitativ, în condiții suficient de blinde pentru menținerea activității specifice a acestuia.

5. — Să poată fi recuperat de multe ori.

Au fost preparați imunosorbenti prin atașare de suporturi celulozice, agaroză, sticlă, prin insolubilizare cu aldehidă glutarică, cloroformat de etil, prin agregare disulfidică și caldură. Au fost utilizați la izolarea și purificarea diferitelor macromolecule: insulină, ARN, betagalactozidază, nuclează stafilo-



cocică, asparaginază, peptide DNP. Astfel s-a evidențiat activitatea de legare a diferitelor proteine mielomatoase (pentru dinitrofenol), au putut fi purificate Ig mielomatoase cu diferiți determinanți idiospecifici; au fost izolați și caracterizați factorii serici responsabili de urticarie „la frig”; au fost izolate imunoglobulinele care se găsesc în cantități mici în ser (IgE și IgD); s-au făcut analize de finețe asupra localizării determinanților antigenici (de exemplu albumina serică umană).

De asemenea au fost izolați anticorpi specifici față de o albumină, ARNt, anti-haptene, anti-Ig, demonstrându-se heterogenicitatea acestora: eluția anticorpilor specifici adsorbiți pe insulină se face în „trepte” la diferite pH-uri, dar toți având activitate specifică față de insulină.

Dacă anticorpii antinuclează sint trecuți pe o coloană cu un peptid insolubilizat preparat din nuclează, aceasta adsoarbe specific 11% din anticopi, demonstrând prezența unuia sau mai multor determinanți antigenici.

Din aproape în aproape pot fi făcute studii de mare finețe asupra determinanților antigenici prezenți într-o moleculă proteică, ajungându-se la izolarea și studierea structurii unui determinant antigenic singular.

### Prepararea imunosorbenților cu aldehida glutarică

1. Insolubilizarea IgG uman: 250 mg IgG uman în 5 ml tampon fosfat 0,1 M, pH 7, la temperatura camerei, este amestecată cu 1 ml soluție apoasă de aldehidă glutarică 2,5%, care se adaugă picătură cu picătură. Gelul se formează aproape instantaneu și după 3 ore la temperatura camerei este bine spălat cu tamponul care va fi folosit la cromatografie și la eluție.

2. Insolubilizarea albuminei serice: 400 mg albumină serică bovină sint dizolvate în 10 ml tampon acetat 0,2 M, pH 5. Se adaugă 2 ml soluție apoasă 2,5% aldehidă glutarică. Se formează un gel după 20 minute, care după 3 ore la temperatura camerei este tratat ca mai sus.

3. Insolubilizarea proteinelor serice umane normale: 10 ml ser normal sint dializați peste noapte față de ser fiziologic rece. Serul dializat este tratat cu 1 ml tampon acetat 1 M, pH 5, sau 1 ml tampon fosfat 1 M, pH 7, după care se adaugă 3 ml soluție de aldehidă glutarică 2,5 %. Gelul care se formează după 20 de minute este lăsat 3 ore la temperatura camerei și apoi este tratat ca mai sus.

### CROMATOGRAFIA ÎN FAZA GAZOASĂ

Cromatografia în faza gazoasă este o metodă modernă utilizată frecvent în analiza chimică.

Elementele principale ale aparatului sint: coloana și detectorul, la care se adaugă următoarele anexe: o sursă de eluant, un dispozitiv de măsurare și reglare a debitului, un dispozitiv de introducere a probei, un termostat și un instrument de înregistrare a semnalelor furnizate de detector.

Eluantul trece prin dispozitivul de introducere a probei, preia proba de analizat și o introduce în coloana cromatografică. În urma interacțiunii moleculelor probei cu faza staționară care se găsește în coloană, are loc repartiția acestora între faza staționară și gazul purtător — se produce o diferențiere a vitezelor lor de migrare și final separarea pe coloană. Eșalonate astfel în timp componentele sint purtate de eluent după ieșirea din coloană în detector. Acesta

transformă diferența unei proprietăți fizice între component și eluent într-un semnal electric proporțional cu concentrația componentului în faza gazoasă.

Reprezentarea grafică a semnalului detectorului în funcție de timp, obținută cu ajutorul înregistratorului, se numește cromatogramă.

Semnalele obținute sub forma unor virfuri, numite picuri, corespund componentelor probei. Timpul în care apare maximul unui pic, măsurat din momentul introducerii probei, se numește timp de retenție  $t_R$  și este caracteristica calitativă a componentului respectiv. Înălțimea picului sau aria suprafeței lui constituie parametrul cantitativ, proporțional cu cantitatea de component din probă.

Coloanele de separare sînt din metal sau sticlă, avînd o lungime de 0,5—3 m și un diametru interior de 3—6 mm. Mai există și coloane capilare de 25—100 m lungime, cu diametrul interior de 0,25 mm. În primul caz coloana este umplută cu fază staționară, care poate fi un absorbant sau un material solid, inactiv, numit suport, impregnat în proporție de 5—20% cu un lichid cu volatilitate redusă. În coloanele capilare, faza staționară solidă sau lichidă este depusă în strat subțire pe pereții interiori ai capilarei.

Dacă se utilizează un adsorbent solid ca fază staționară se realizează cromatografia gaz-solid, iar dacă faza staționară este un lichid se vorbește de cromatografia gaz-lichid.

Eluantul este un gaz puțin reactiv — azot, heliu, argon.

Coloana cromatografică se menține la temperaturi cuprinse între 25—250°. Durata analizei variază după numărul componentelor și tipul de coloană utilizat între cîteva minute și o oră.

În cazul analizei gaz cromatografice a compușilor biologici trebuie să se țină seama de cîteva proprietăți ale acestor clase de substanțe și anume:

Compușii biologici sînt relativ nevolațili, deci pot fi analizați gaz cromatografic numai după conversia lor în derivați volatili. Studiul reacțiilor chimice de conversie a acestor compuși în substanțe volatile gaz cromatografic este o parte importantă a tehnicii gaz cromatografice. Mulți compuși biologici sînt sensibili la temperatură ridicată, fiind supuși unor reacții de descompunere și rearanjare termică și catalitică. Alții au o greutate moleculară mare și cer temperaturi relativ ridicate pentru o analiză gaz cromatografică eficientă. Deci, pentru a obține rezultate optime în analiza acestor compuși, este necesară o atenție specială în selectarea sistemului cromatografic și a coloanei.

Expunerea compușilor organici sensibili unor suprafețe metalice încălzite la o temperatură înaltă, conduce deseori la reacții de descompunere. Cele mai bune rezultate se obțin avînd un sistem cromatografic în întregime din sticlă, proba fiind injectată direct pe coloană.

Unii compuși biologici necesită temperaturi scăzute în timpul analizei pentru a înlătura descompunerea lor. Pentru a se obține timpi de retenție rezonabili trebuie folosite coloane cu procent mic de fază staționară.



## METODE IMUNOCHIMICE

Metodele imunochimice sînt metode bazate pe reacția de precipitare a antigenului cu anticorpul în mediu lichid sau solid.

### ANTIGENUL

Antigenul este o substanță care introdusă în organismul animal determină un răspuns imun (imunogenitate) caracterizat prin apariția anticorpilor și a limfocitelor sensibilizate. Totodată el poate reacționa specific cu anticorpii ori cu celulele asociate acestui răspuns (reactivitate). Antigenele au structura chimică foarte variată, în general sînt: proteine, polizaharide sau combinații între acestea și lipide.

Un antigen pentru a fi capabil să inducă un răspuns imun specific, deci pentru a fi imunogen, trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să aibă o moleculă relativ mare;
- să poată fi degradat în organism, descompunerea să fie efectuată în fragmente cu o greutate moleculară suficient de mare și să conțină unele din grupările determinante ale moleculei intacte;
- să prezinte determinanți antigenici străini de celula animalului — moleculă „nonpropriu” (nonself), determinanți capabili să declanșeze fiecare în parte sinteza unui anticorp specific.

Condițiile enumerate asigură imunogenicitate numai împreună, luate individual sînt necesare dar nu suficiente.

Noțiunea de imunogenicitate cuprinde atît proprietățile antigenului injectat cît și răspunsului organismului în care acesta se administrează (antigenicitate + răspuns în anticorpi = imunogenicitate). Specificitatea antigenului revine determinantului antigenic sau haptenei. Determinantul antigenic este un loc de pe antigen pe care se atașează în mod specific anticorpul. Haptena este o substanță chimică (acid tartric, dinitrofenil etc.) care cu toate că este specifică imunologic și chimic activă, nu poate induce singură formarea





Imunoglobulinele, spre deosebire de celelalte proteine, pot fi antigene ca moleculă proteică și anticorp ca funcție.

La om se cunosc 5 clase principale de imunoglobuline, notate: IgG, IgA, IgM, IgE și IgD, puse în evidență prin metoda imunoelectroforezei. Poziția acestor 5 fracțiuni imunoglobulinice este redată în figura 8.

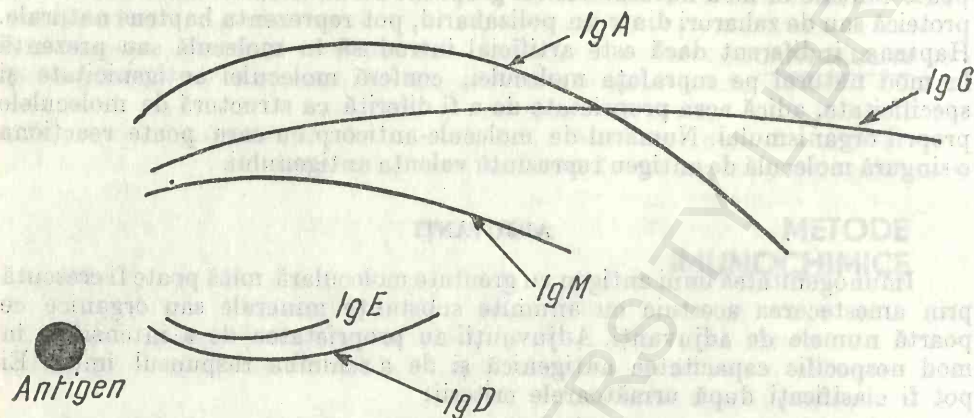


Fig. 8. — Poziția celor 4 fracțiuni imunoglobulinice ale serului uman.

Din cantitatea totală de anticorpi, IgG reprezintă aproximativ 75%, IgA și IgM își împart aproape egal restul de 30% din anticorpi.

Proprietățile fizice și chimice ale imunoglobulinelor G, A, M, D și E sînt redată în tabelul LXX.

Din tabelul LXX reies diferențele existente între fracțiunile proteice purtătoare de anticorpi.

Tabelul LXX

Proprietățile chimice și fizice ale Ig

|                                   | IgG       | IgA     | IgM     | IgD    | IgE |
|-----------------------------------|-----------|---------|---------|--------|-----|
| Cantitatea (mg% ml)               | 800—1600  | 100—350 | 80—160  | 0,3—40 | 0,3 |
| mg N%                             | 15,64     | 16,20   | 14,47   | —      | —   |
| Glucide totale (%)                | 2,58      | 10,66   | 9,80    | —      | —   |
| Greutate moleculară               | 150 000   | 150 000 | 900 000 | —      | —   |
| Constanta de sedimentare (WS)     | 7         | 7—13    | 18—32   | 7      | 7   |
| Sinteza<br>catabolism {           | g% .....  | 2,3     | 2,7     | 0,4    | —   |
|                                   | 24 de ore | 3       | 12      | 1,4    | —   |
| Factor genetic Gm                 | +         | 0       | 0       | —      | —   |
| Factor genetic Inv                | +         | +       | +       | —      | —   |
| Trecerea peste bariera placentară | +         | —       | —       | —      | —   |



## STRUCTURA IMUNOGLOBULINELOR

Toate cercetările privind constituția proteinelor purtătoare de anticorpi au pus în evidență în molecula imunoglobulinelor două tipuri de lanțuri polipeptidice, lanțul ușor (light) și lanțul greu (heavy).

Imunoglobulinele conțin în afară de proteine și cantități mici de glucide; sînt deci glicoproteine multilant, cu formula generală  $(HL)_{2n}$  în care:

H = lanț greu;

L = lanț ușor;

n = 1 pentru IgG, IgD și IgE;

n = 1, 2 sau 3 pentru IgA;

n = 5 pentru IgM

Ele sînt proteine plasmatice heterogene avînd comun:

— locul de sinteză

— structura chimică

— caracterul policlonal

— activitatea biologică (anticorpii).

Din punct de vedere chimic imunoglobulinele se formează prin legarea, unul de celălalt, a unui număr mai mare sau mai mic de aminoacizi.

Aceștia constituie materia primă în sinteza de proteine și sînt compuși dintr-un rest organic „R” de care se leagă o grupă carboxil  $\text{COOH}$  (acidă) și o grupă amino  $\text{NH}_2$  (bazică).

Prin eliminarea unei molecule de apă, între cele două grupări opuse se realizează legarea aminoacizilor, ducînd astfel la formarea lanțurilor polipeptidice. Succesiunea aminoacizilor în lanțul respectiv este impusă de informația deținută de acizii nucleici și se numește secvență. În vederea obținerii unor date cit mai concludente asupra structurii moleculei imunoglobulinelor, cercetările au fost axate pe separarea și fragmentarea lor în subunități.

În scopul obținerii acestor subunități s-au folosit procedee bazate pe acțiunea hidrolitică a unor enzime proteolitice (pepsina, tripsina, papaina, chimotripsina, pronaza) precum și pe ruperea legăturilor disulfidice covalente interlanțuri, sub acțiunea agenților chimici reducători (cisteina cis), 2 $\beta$ -mercaptoetanol (ME); mercaptoetanolamină (MEA), ditiotreititol (DTT).

Tot în acest scop a fost folosit și procedeul cianolizei cu cianură de brom ( $\text{BrCN}$ ). Pentru caracterizarea fragmentelor obținute se folosesc metodele fizice, chimice, imunochimice și imunologice.

Sub acțiunea reducătoare a 2 $\beta$ -mercaptoetanolului, moleculele de Ig au putut fi scindate în lanțuri „H” și „L” care pot fi apoi recombinate prin diferite procedee ce constau în îndepărtarea reducătorului. Un lanț polipeptidic conține două capete distincte, unul care poartă gruparea aminică — capătul „N” terminal, iar celălalt gruparea carboxilică — capătul „C” terminal.

Lanțurile „L” sau lanțurile ușoare, sînt comune tuturor claselor de Ig și au greutatea moleculară 22 000. Ele sînt de două tipuri — tip I sau tip K ( $\kappa$ ) și tip II sau tip  $\lambda$  (lambda). Formula moleculară a imunoglobulinelor, în funcție de cele două lanțuri ușoare, este dată în tabelul LXXI.

## Formula moleculară a imunoglobulinelor

| Nomenclatura obișnuită                                                                                 | Notăția imunoglobulinelor                                                              | Formula moleculară a imunoglobulinelor                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| $\begin{matrix} 7 \text{ S}\gamma - \text{tip I} \\ 7 \text{ S}\gamma - \text{tip II} \end{matrix} \}$ | $\begin{matrix} \gamma\text{KG sau IgGK} \\ \gamma\text{GL sau IgGL} \end{matrix} \}$  | $\begin{matrix} \gamma_2\text{K}_2 \\ \gamma_2\lambda_2 \end{matrix} \}$ |
| $\begin{matrix} \gamma_1\text{A} - \text{tip I} \\ \gamma_1\text{A} - \text{tip II} \end{matrix} \}$   | $\begin{matrix} \gamma\text{AK sau Ig AK} \\ \gamma\text{AL sau IgAL} \end{matrix} \}$ | $\begin{matrix} \alpha_2\text{K}_2 \\ \alpha_2\lambda_2 \end{matrix} \}$ |
| $\begin{matrix} \gamma_1\text{M} - \text{tip I} \\ \gamma_1\text{M} - \text{tip II} \end{matrix} \}$   | $\begin{matrix} \gamma\text{MK sau IgMK} \\ \gamma\text{ML sau Ig ML} \end{matrix} \}$ | $\begin{matrix} \mu_2\text{K}_2 \\ \mu_2\lambda_2 \end{matrix} \}$       |
| $n = 5$                                                                                                |                                                                                        | $\text{K}_2 = \lambda_2 = \text{forma dimeră}$                           |

În funcție de lanțurile ușoare de tip K și  $\lambda$ , cele cinci imunoglobuline G, A, M, D și E sînt asociate în 10 forme.

Notăția corectă a imunoglobulinelor, în funcție de lanțurile polipeptidice, este următoarea: în primul rînd se scrie formula moleculară, iar în paranteze se poate indica boala Waldenström sau tipul de mielom IgG, IgA și Bence-Jones.

În constituția lanțului ușor intră 217 aminoacizi dintre care 107, cei dinspre capătul C-terminal, alcătuiesc regiunea invariabilă (C = constantă), iar restul dinspre capătul N-terminal alcătuiesc regiunea variabilă (V = variabil). Regiunea variabilă pentru lanțurile K are 3 subgrupe (VKI, CKII, VKIII) iar pentru lanțurile  $\lambda$  5 subgrupe (V $\lambda$ I, V $\lambda$ II, V $\lambda$ III, V $\lambda$ IV, V $\lambda$ V).

Cele două regiuni V și C ale lanțului „L” sînt de aceeași mărime și fiecare conține o punte disulfidică intralanț (S—S).

Lanțurile ușoare sînt suporturile factorului INV determinant, care dă specificitatea alotipică (allos = altul și typos = caracter).

Această specificitate diferă de la individ la individ în funcție de aminoacizii specifici ce se găsesc în molecula imunoglobulinelor (valină și leucină).

Lanțurile „H” sau lanțurile grele, diferențiază imunoglobulinele din punct de vedere antigenic. Ele au o secvență caracteristică pentru fiecare imunoglobulină și pentru a se deosebi unele de altele au fost notate cu litere grecești corespunzătoare simbolului pe care îl poartă:

- lanț  $\gamma$                       pentru IgG;
- lanț  $\alpha$                       pentru IgA;
- lanț  $\mu$                       pentru IgM;
- lanț  $\delta$                       pentru IgD;
- lanț  $\epsilon$                       pentru IgE.

Din punct de vedere imunologic, s-a putut demonstra că lanțurile grele de IgG, IgA și IgM aparțin unor anumite subclase, iar din combinațiile lor cu lanțul ușor rezultă marea varietate de imunoglobuline.

La individul normal există toate tipurile de IgG în proporție de 66%, 20%, 8%, 6%, pentru celelalte imunoglobuline tipurile fiind mai puțin studiate, problema nu este încă elucidată.



## Clasele și subclasele imunoglobulinelor

| Clasa | Lanț greu („H“) | Subclasa       |                |                |                |
|-------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| IgG   | γ               | γ <sub>1</sub> | γ <sub>2</sub> | γ <sub>3</sub> | γ <sub>4</sub> |
| IgA   | α               | α <sub>1</sub> | α <sub>2</sub> |                |                |
| IgM   | μ               | μ <sub>1</sub> | μ <sub>2</sub> |                |                |

Lanțurile grele dețin cantitatea totală a zaharurilor din molecula de imunoglobulină și au greutatea moleculară 52 000, avînd în constituția lor un număr de 440 de aminoacizi care ca și în cazul lanțurilor ușoare, cei dinspre capătul C-terminal alcătuiesc regiunea invariabilă, iar cei dinspre capătul N-terminal, alcătuiesc regiunea variabilă, care prezintă 3 subgrupe: VH<sub>I</sub>, VH<sub>II</sub>, VH<sub>III</sub>.

În figura 9 este prezentată structura unei molecule de Ig mielomatoase, în care se observă delimitarea fragmentelor C și V, locurile de clivare a tripsinei și locul de legare a carbohidratului.

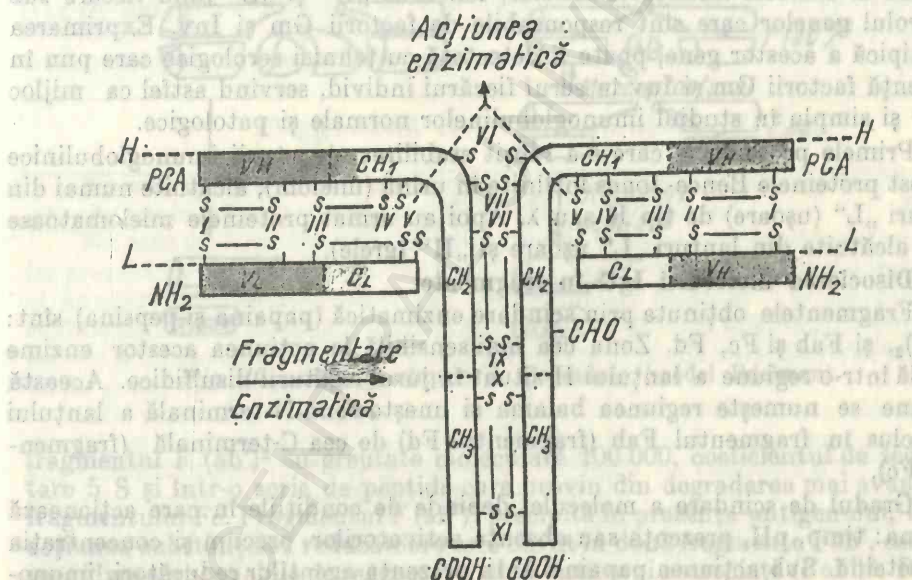


Fig. 9. — Structura moleculei de IgG.

Începînd de la capătul NH<sub>2</sub> terminal, care este de obicei P.C.A. (o formă ciclizată a acidului glutamic) se remarcă 4 regiuni aproximativ egale: VH, VH, CH<sub>1</sub>, CH<sub>1</sub>, fiecare conținînd o punte S—S' intralanț.

Aceste regiuni se diferențiază atât ca structură, cit și ca proprietăți fizico-chimice și funcționale.

1117 Regiunea  $V_H$  este implicată în legarea de antigen.

Regiunea  $C_H$ , și  $C_H$ , asigură flexibilitatea necesară combinării cu antigene și accesul enzimelor proteolitice: este regiunea „balama” a moleculei. De regiunea  $C_H$ , de un rest Asp -este legat și glucidul cu rol de transportor prin membrană.

Regiunea  $COOH$  terminală este implicată în formarea polimerilor.

Regiunile  $V_H$  și  $C_H$ , alcătuiesc fragmentul Fd de lanț „H”.

Regiunile  $C_H$ , și  $C_H$ , alcătuiesc fragmentul Fc de lanț „H”.

Regiunea  $V_H$  prezintă o mare variabilitate. S-au putut totuși stabili 3 subgrupe la IgG, care nu sînt legate de apartenența la o clasă sau subclasă anumită:  $V_{HI}$ ,  $V_{HII}$ ,  $V_{HIII}$ .

Determinanții izotipici pentru clasă sau subclasă sînt localizați în regiunea  $C_H$  la  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_4$  și Fc pe  $\gamma_3$ .

S-au descris pînă în prezent aproximativ 20 de determinanți alotipici (genetici) Gm cu localizare în anumite subclase.

Lanțurile grele  $\gamma$  sînt expresia factorului Gm, determinant care are specificitate alotipică. Factorii specifici Gm sînt legați numai de IgG, pe cînd factorii sistemului Inv se găsesc legați de orice Ig.

Aceste fapte prezintă un mare interes, deoarece explică mecanismul genetic al sintezei imunoglobulinelor, lanțurile „H” și „L” fiind fiecare sub controlul genelor care sînt responsabile de factorii Gm și Inv. Explicarea fenotipică a acestor gene, poate fi detectată cu tehnici serologice care pun în evidență factorii Gm și Inv în serul fiecărui individ, servind astfel ca mijloc sigur și simplu în studiul imunoglobulinelor normale și patologice.

Primele proteine la care s-a reușit stabilirea structurii imunoglobulinice au fost proteinele Bence-Jones întîlnite în urină (mielom), alcătuite numai din lanțuri „L” (ușoare) de tip K sau  $\lambda$ . Apoi au urmat proteinele mielomatoase IgG alcătuite din lanțuri „L” ușoare și „H” (grele).

#### Disocierea moleculei IgG în fragmente

Fragmentele obținute prin scindare enzimatică (papaina și pepsina) sînt:  $F(ab)_2$ , și Fab și Fc, Fd. Zona cea mai sensibilă la acțiunea acestor enzime se află într-o regiune a lanțului H situat în jurul legăturii disulfidice. Această regiune se numește regiunea balama și unește zona N-terminală a lanțului H inclus în fragmentul Fab (fragmentul Fd) de cea C-terminală (fragmentul Fc).

Gradul de scindare a moleculei depinde de condițiile în care acționează enzima: timp, pH, prezența sau absența activatorilor, precum și concentrația în proteină. Sub acțiunea papainei și în prezența agenților reducători, imunoglobulinele umane sînt scindate în trei fragmente, dintre care două sînt identice iar a treia este separabilă de celelalte prin cromatografie pe coloană sau electroforeză. Fragmentele prime se notează Fab (antigen-binding) și ultimul fragment care a putut fi cristalizat se notează cu Fc (cristalizabile). Fragmentul Fab este constituit dintr-un lanț ușor și partea N-terminală a unui lanț greu denumit Fd. Acest fragment este purtătorul situsurilor de combinare ale anticorpilor. Fragmentul Fc reprezintă partea C-terminală a lanțurilor grele și este purtătorul situsurilor responsabile de fixare a complementului. Greu-



tatea moleculară este de 48 000 pentru Fc și 52 200 pentru Fab. Ambele tipuri de fragmente prezintă un coeficient de sedimentare de 3,5 S. După îndepărtarea agentului reducător, fragmentul Fab este capabil de a se recombina, dând anticorpii reasociați.

O altă enzimă folosită pentru elucidarea structurii imunoglobulinelor este pepsina. S-a demonstrat că această enzimă hidrolizează imunoglobulina în

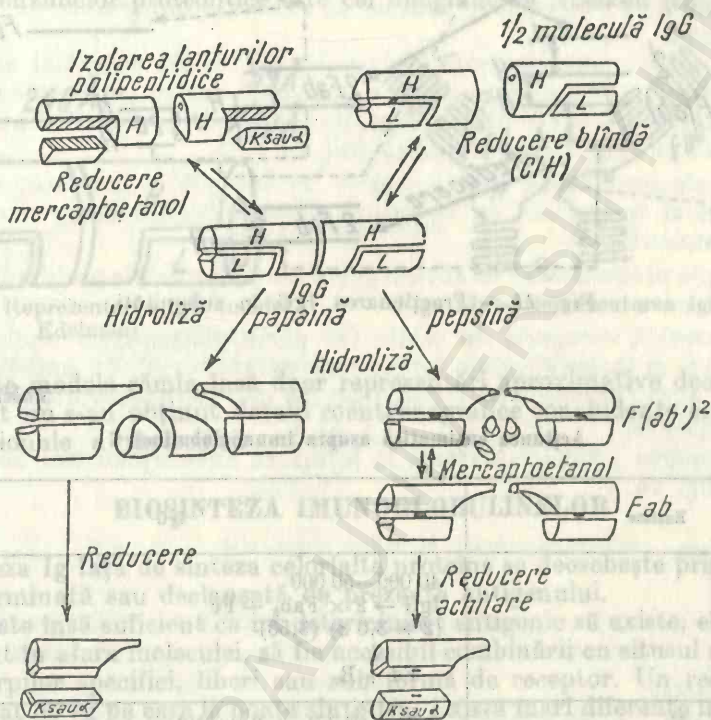


Fig. 10. — IgG și etapele de degradare (model Edelman).

fragmentul F (ab')<sup>2</sup> cu greutate moleculară 100 000, coeficientul de sedimentare 5 S și într-o serie de peptide care provin din degradarea mai avansată a fragmentului Fc. Fragmentul F (ab')<sup>2</sup> precipită în prezența antigenului, iar sub acțiunea substanțelor reducătoare este clivat în două fragmente Fab', care prin reoxidare sînt capabile de reagregare, dînd anticorpi reasociați (Fab')<sup>2</sup>. Recombinarea fragmentelor Fab obținute prin hidroliza papainică a fragmentului pepsinic F (ab')<sup>2</sup> nu a putut fi încă realizată. Fragmentele Fab și Fab' și (Fab')<sup>2</sup> constituie, atît din lanțurile „L” intacte, cît și dintr-o parte a lanțurilor „H”, prezintă activitate de anticorpi. Fragmentele Fc sînt alcătuite din resturi de lanțuri „H” și sînt lipsite de această activitate.

În tabelul LXXIII sînt prezentate fragmentele obținute prin acțiunea enzimatică asupra imunoglobulinelor manomere (IgG, 7S, GM = 150 000) și constantelor lor. În figurile 9 și 10 sînt reprezentate etapele de degradare a IgG.

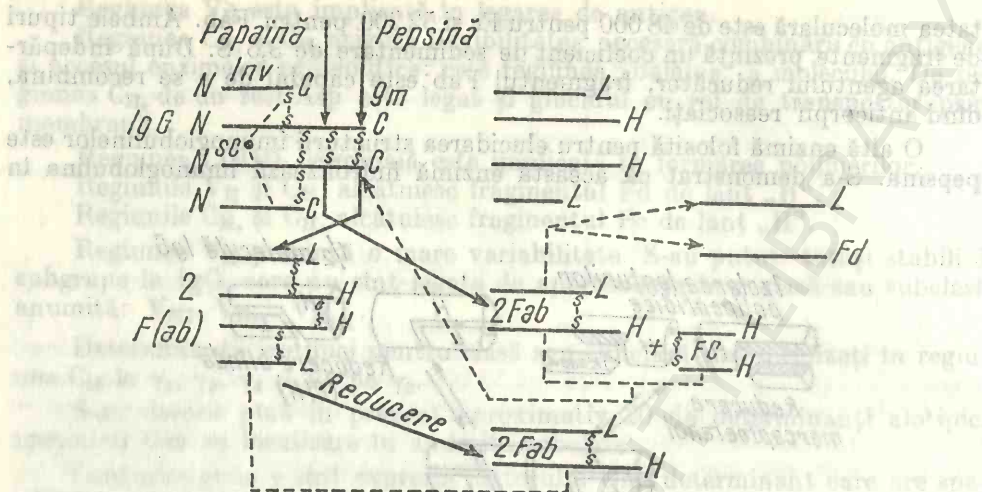


Fig. 11. — Fraționarea IgG în subunități.

Tabelul LXXIII

Aciunea enzimatică asupra imunoglobulinei G

| Enzime         | IgG                                                                                                                                                           |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Papaină        | $40\,000-50\,000$<br>$\text{IgG} \rightarrow 2 \times \text{Fab}_2 + \text{Fc}$<br>$(2 \times 3,5\text{ S}) (3,55)$<br>$\downarrow$<br>$\text{Fd} + \text{R}$ |
| Pepsină pH = 5 | $\text{IgG} \rightarrow (\text{Fab}')_2 + 3 \text{ peptide}$<br>$1 \times 5\text{ S}$<br>$\downarrow$<br>$\text{R}$<br>$2\text{Fab}'$                         |
| Tripsină       | $\text{IgG} \rightarrow 2 \times \text{Fab}(t) + \text{Fc}(t)$<br>$(2 \times 3,55)$                                                                           |

S-a arătat de asemenea că din punct de vedere antigenic imunoglobulinele sînt heterogene, prezentînd specificitate: izotopică, alotipică și idiotipică:

1) izotopică comună tuturor indivizilor din aceeași specie definește clasele sau subclasele imunoglobulinelor;

2) alotipică diferă de la individ la individ în cadrul aceleiași specii, definește un polimorfism genetic (Inv, Gm);

3) idiopatică reflectă aspectul particular (structură primară și conformația moleculară specifică) a unui anumit situs de anticorp la același individ.



Disocierea moleculei de IgG în lanțurile H, L și fragmentele Fab, F(ab')<sup>2</sup>, Fe, Fd a contribuit la stabilirea modelului de structură în spațiu a acestora. Primul model a fost imaginat de Edelman (fig. 12), formă cilindrică util pentru, prezentarea acțiunii enzimelor proteolitice asupra Ig dar în forma sa inițială s-a dovedit a fi incomplet. Un alt model care are meritul să releve marea flexibilitate din regiunea de legare H—H(balama) ca și accesibilitatea în aceste regiuni a enzimelor proteolitice este cel imaginat de Noelken (fig. 13).

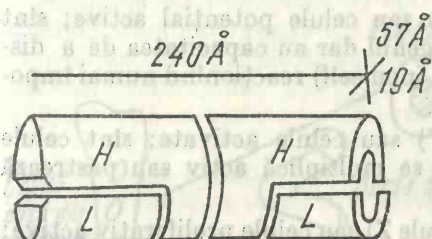


Fig. 12. — Reprezentarea IgG (model Edelman)

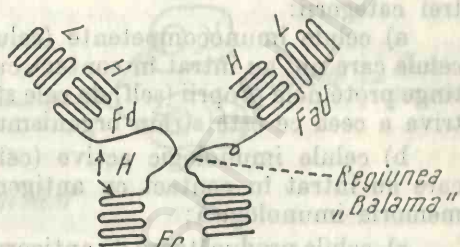


Fig. 13. — Reprezentarea IgG (Noelken).

Aceste modele rămân însă doar reprezentări aproximative deoarece pînă în prezent nu s-au obținut detalii roentgenografice concludente asupra stării tridimensionale a moleculei.

## BIOSINTEZA IMUNOGLOBULINELOR

Sinteza Ig față de sinteza celorlalte proteine se deosebește prin faptul că este determinată sau declanșată de prezența antigenului.

Nu este însă suficient ca un determinant antigenic să existe, el trebuie să fie prezent în afara moleculei, să fie accesibil combinării cu situsul combinativ al anticorpilor specifici, liberi sau sub formă de receptor. Un receptor este reprezentat de Ig pe care le poate sintetiza. Există mari diferențe în populația de celule imunocompetente din punct de vedere al receptorilor pentru recunoașterea și reacția cu antigenul.

Din momentul introducerii în organism a antigenului și pînă la anihilarea lui au loc o serie de transformări celulare și biochimice, care au la bază angajarea celulelor limfoide în captarea și digestia lui enzimatică cit și în procesul de producere a anticorpilor specifici.

Sinteza Ig urmează aceleași legi generale ale sintezei proteinelor. Ea se face la nivelul ribosomilor din celulele formatoare de anticorpi: plasmocit și limfocit.

Plasmocitele, principalele celule producătoare de Ig, sint bogate în acizi ribonucleici, conțin o mare cantitate de citoplasmă și au un reticul endoplasmatic foarte bine dezvoltat. Aceste elemente sint caracteristice celulelor în care are loc un intens proces de sinteză a proteinelor. Durata medie de viață a plasmocitelor este de numai 7 zile și apoi dispar; ele nu se divid.

Limfocitele, spre deosebire, de plasmocite, sint celule slab producătoare de Ig. Ele sint mici și au un nucleu care ocupă aproape întreaga celulă, iar reticulul endoplasmatic este rudimentar. Durata medie de viață a limfocite-

lor este de 100—200 zile, unele pot persista chiar ani și au proprietatea de a se devida. Din limfocitele mici se diferențiază celule cu diametru dublu sau chiar mai mare, denumite limfoblaști. Acestea au capacitatea mult mai mare de a sintetiza decât limfocitele, dar mai mică decât a plasmocitelor. În urma unui contact cu antigenul, limfocitul suferă diferențiere și diviziune, faze în care este capabil să producă anticorpi.

Până la apariția plasmocitelor fiind nevoie de un anumit timp, în această perioadă anticorpii sint sintetizați numai de limfocite, în cantitate mică.

Aceste celule limfoide, în funcție de excitația antigenică, se împart în trei categorii:

a) celule imunocompetente (celule X) sau celule potențial active; sint celule care nu au intrat în contact cu antigenul dar au capacitatea de a distinge proteinele proprii (self) de cele străine (non self) reacționind numai împotriva a ceea ce este străin organismului;

b) celule imunologic active (celule Y) sau celule activate; sint celule care au intrat în contact cu antigenul și se multiplică activ sau păstrează memoria imunologică;

c) celule producătoare de anticorpi (celule Z) sau celule proliferativ active; sint celule care secretă anticorpi.

Din această categorie de celule fac parte plasmocitele imature (celule proliferative) și mature (celule formatoare de anticorpi). În ambele feluri de celule s-au pus în evidență anticorpi, însă cea mai mare cantitate este prezentă în cele mature.

Participarea celulelor limfoide la formarea anticorpilor este redată schematic în fig. 14.

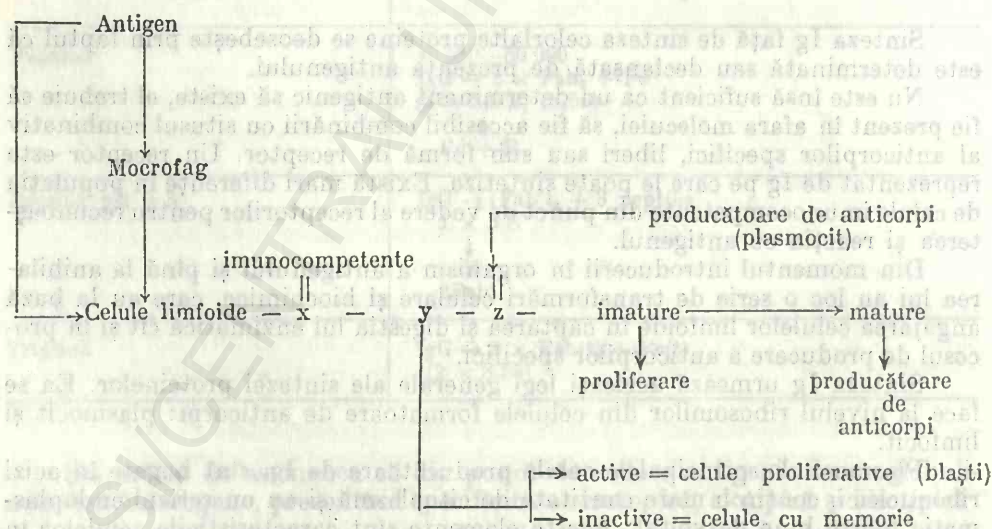


Fig. 14. — Celulele care participă la sinteza anticorpilor.

Din punct de vedere morfologic, aceste activități fiziologice se traduc prin transformări blastice de tipul limfocit-limfoblast-plasmoblast-plasmocit.



Celulele limfoide care primesc stimulul antigenului direct sau prin intermediul macrofagului sînt distribuite în organele limfoide centrale și periferice (splină, ganglioni limfatici) și își au originea în timus și măduva osoasă.

Toate limfocitele provenite din măduva osoasă care se maturizează (provin sau derivă) din timus au primit denumirea generică de celule T, așa cum cele provenite tot din măduva osoasă dar maturizate în alte focare limfoide diseminate sînt denumite celule B (bone marrow = măduva osoasă) (fig. 15).

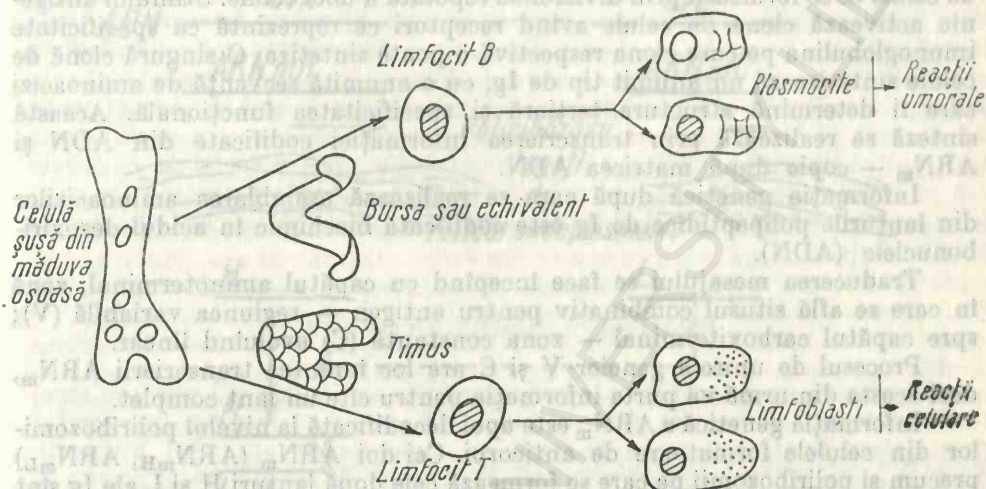


Fig. 15. — Maturarea celulelor imunocompetente.

Descrierea celor două tipuri de celule limfocitare, reprezentarea schematică a răspunsului imun precum și metodele de imunologie celulară aplicate în laboratorul clinic, vezi addendum.

Răspunsul imun umoral poate să apară la o primă administrare a antigenului, numindu-se

- răspuns primar
- sau la o a doua administrare numindu-se
- răspuns secundar

Cantitatea de anticorpi în răspunsul secundar depășește cu mult pe cea din răspunsul primar.

Anticorpii formați în răspunsul secundar diferă de cei formați în răspunsul primar, prin faptul că au o mare afinitate de combinare cu antigenele și aparțin aproape exclusiv tipului de IgG, nu tipului de IgM ca în cazul răspunsului primar.

În răspunsul primar antigenul determină trecerea celulelor X în celule Y și proliferarea acestora.

Dacă doza de antigen administrată este mai mare sau se asociază cu adjuvant, astfel ca antigenul să persiste mai mult în organism, atunci ele pot trece chiar în celulele Z.

În răspunsul secundar a doua injecție găsim un număr mai mare de celule Y (celule cu memorie imunologică) trecerea în celulele Z este mai rapidă. Numărul lor fiind în acest caz de 100 de ori mai mare decât în răspunsul primar, cantitatea de anticorpi este mult crescută. Creșterea cantității de anticorpi după a doua injecție este cauzată de prezența numărului mare de celule Z, și nu de faptul că o celulă în acest stadiu sintetizează mai mulți anticorpi.

Prezența unui antigen specific în organism determină deci proliferarea celulară. Celula începe să se dividă dând naștere unei clone, adică unei populații de celule ce se formează prin diviziunea repetată a unei celule. Stimulul antigenic activează clona de celule având receptori ce reprezintă ca specificitate imunoglobulina pe care clona respectivă o poate sintetiza. O singură clonă de celule sintetizează un anumit tip de Ig, cu o anumită secvență de aminoacizi care îi determină structura terțiară și specificitatea funcțională. Această sinteză se realizează prin transcrierea informației codificate din ADN și  $ARN_m$  — copie după matricea ADN.

Informația genetică după care se realizează asamblarea aminoacizilor din lanțurile polipeptidice de Ig este codificată biochimic în acidul dezoxiribonucleic (ADN).

Traducerea mesajului se face începînd cu capătul aminoterminal, zonă în care se află situsul combinativ pentru antigen — regiunea variabilă (V); spre capătul carboxiterminal — zona constantă (C) evoluînd linear.

Procesul de unire a genelor V și C are loc înaintea transcrierii  $ARN_m$ , deci acesta din urmă va purta informația pentru cite un lanț complet.

Informația genetică a  $ARN_m$  este apoi decodificată la nivelul poliribozomilor din celulele formatoare de anticorpi. Cei doi  $ARN_m$  ( $ARN_{mH}$ ,  $ARN_{mL}$ ) precum și poliribozomii pe care se formează cele două lanțuri H și L ale Ig sînt diferiți ca dimensiune, iar mărimea poliribozomilor este proporțională cu lungimea  $ARN$ -ului mesager. Poliribozomii alcătuiți din 7—8 ribozomi sintetizează lanțul L, în timp ce poliribozomii alcătuiți din 16—18 ribozomi sintetizează lanțurile H, avînd un  $ARN_m$  constînd din aproximativ 1350 nucleotide.

Sinteza celor două feluri de lanțuri este în mod normal bine echilibrată.

Moleculele de Ig fiind sintetizate inițial ca subunități (H, L), se assemblează ulterior în cisternele reticulului endoplasmatic, în două etape succesive, fără intervenția nici unui mecanism enzimatic special.

S-au putut pune în evidență și diferiți compuși intermediari: două lanțuri grele (H—H) sau două lanțuri grele și unul ușor (H—H—L).

Figura 16 reprezintă schematic etapele de sinteză a imunoglobulinelor.

Formarea punții disulfidice între cele două lanțuri H se realizează fie pe poliribozomi, fie după desprinderea de pe ei.

După asamblarea lanțurilor la nivelul ribozomilor fixați pe reticulul endoplasmatic (microzomi) are loc adaosul porțiunii glucidice care va conferi moleculei o anumită rigiditate.

Procesul de fixare a carbohidraților justifică o perioadă de latență pînă la 60' din momentul în care s-au format lanțurile și pînă la evacuarea moleculei de  $Ig(HL)_2$ . Aceste molecule formate din 2 perechi de lanțuri polipeptidice au totdeauna o simetrie a zonelor de combinare (combining sites) cu grupările determinante ale antigenului, fiind 2 sau multiplu de 2.

În unele condiții patologice aceste procese biochimice normale pot fi substanțial modificate. Modificarea constă de cele mai multe ori într-o perturbare a proceselor care reglează proliferarea celulelor producătoare de imuno-



globuline sau/și dereglarea sintezei și asamblării unor componente ale imunoglobulinelor.

Imunoglobulinele sintetizate se adună în cisternele reticulului endoplasmatic și apoi părăsesc celula prin intermediul aparatului Golgi, care este o

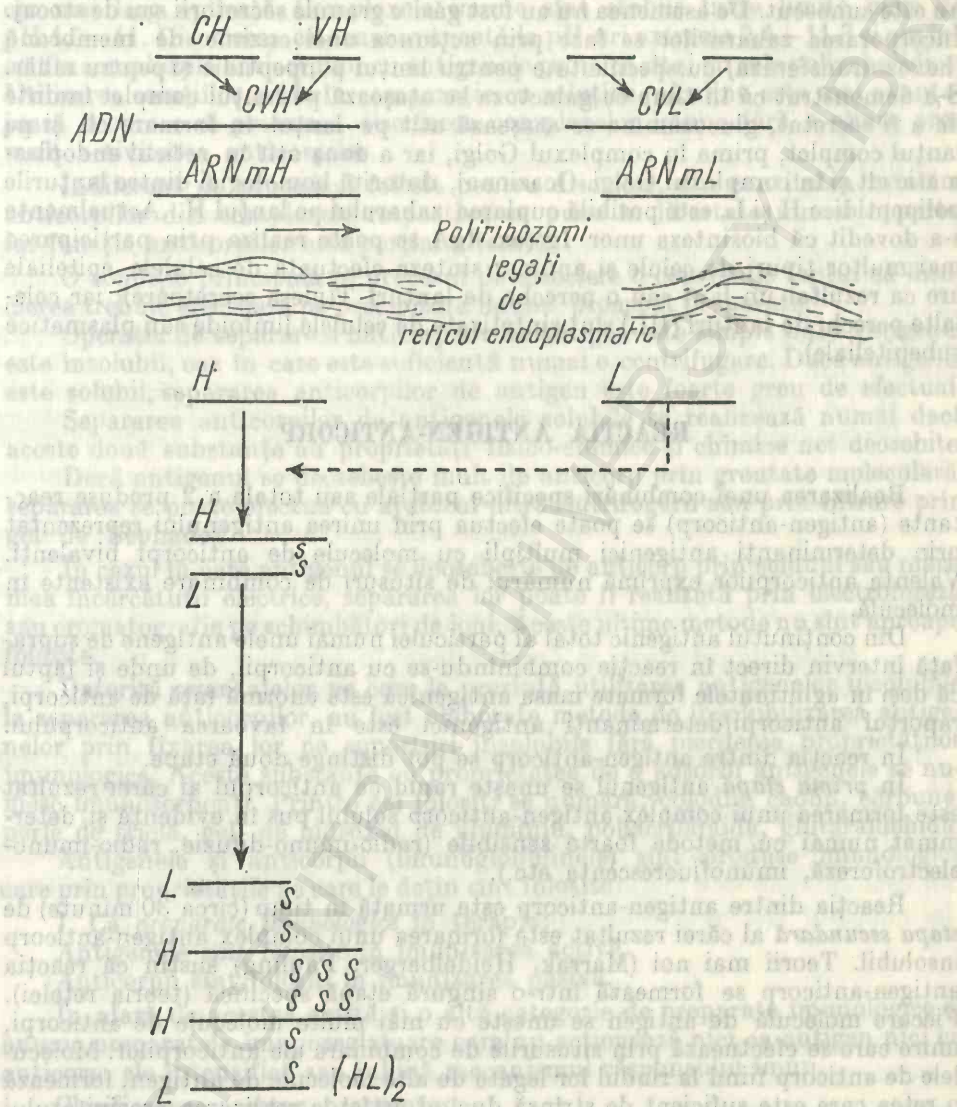


Fig. 16. — Etapele biosintezei imunoglobulinelor.

formație subcelulară plasată în apropierea nucleului și care conține o îngrămădire de corpi ovali sau rotunzi înveliți de o membrană netedă. Ig, prin fragmentul Fc, se leagă de membrana veziculei Golgi, care migrează spre membrana plasmatică. Prin procesul de pinocitoză, Ig rămâne atașată prin fragmentul Fc

de membrana plasmatică, iar la exterior se evidențiază fragmentul Fab care este capabil să lege antigenul.

În funcție de distanța dintre poliribozomi și complexul Golgi, transportul Ig este rapid sau încet. La acest transport se pare că participă și partea glucidică a Ig. Mecanismul de transport al Ig din aparatul Golgi în spațiul celular extern nu este cunoscut. De asemenea nu au fost găsite granule secretorii sau de stocaj. Încorporarea zaharurilor se face prin acțiunea unei enzime de membrană (hexozotransferaza) cu specificitate pentru lanțul polipeptidic și pentru zahăr. S-a demonstrat că în timp ce galactoza se atașează pe lanțul complet înainte de a fi secretat, glucozamina se atașează atît pe lanțul în formare cît și pe lanțul complet, prima în complexul Golgi, iar a doua atît în reticul endoplasmatic cît și în complexul Golgi. Ocazional, datorită homologiei dintre lanțurile polipeptidice H și L, este posibilă cuplarea zaharului pe lanțul H. Actualmente s-a dovedit că biosinteza unor Ig (ex. IgA se poate realiza prin participarea mai multor tipuri de celule și anume: sinteza efectuată de celulele epiteliale are ca rezultat un lanț sau o pereche de lanțuri T(piesa secretoare), iar celelalte perechi de lanțuri (HL) sînt sintetizate de celulele limfoide sau plasmactice subepiteliale).

## REAȚIA ANTIGEN-ANTICORP

Realizarea unei combinații specifice parțiale sau totale a 2 produse reactante (antigen-anticorp) se poate efectua prin unirea antigenului reprezentat prin determinanți antigenici multipli cu molecule de anticorpi bivalenți. Valența anticorpilor exprimă numărul de situsuri de combinare existente în moleculă.

Din conținutul antigenic total al particulei numai unele antigene de suprafață intervin direct în reacție combinîndu-se cu anticorpii, de unde și faptul că deși în aglutinatele formate masa antigenică este enormă față de anticorpi, raportul anticorpi/determinanți antigenici este în favoarea anticorpului.

În reacția dintre antigen-anticorp se pot distinge două etape.

În *prima etapă* antigenul se unește rapid cu anticorpul al cărei rezultat este formarea unui complex antigen-anticorp solubil pus în evidență și determinat numai cu metode foarte sensibile (radio-imuno-difuzie, radio-imuno-electroforeză, imunofluorescența etc.).

Reacția dintre antigen-anticorp este urmată în timp (circa 30 minute) de *etapa secundară* al cărei rezultat este formarea unui complex antigen-anticorp insolubil. Teorii mai noi (Marrak, Heidelberger, Pauling) susțin că reacția antigen-anticorp se formează într-o singură etapă specifică (teoria rețelei). Fiecare moleculă de antigen se unește cu mai multe molecule de anticorpi, unire care se efectuează prin situsurile de combinare ale anticorpilor. Moleculele de anticorp fiind la rîndul lor legate de alte molecule de antigen, formează o rețea care este suficient de strînsă ducînd astfel la realizarea precipitatului (antigen-anticorp) insolubil.

După alte teorii formarea rețelei este necesară dar nu suficientă: Precipitarea complexului imun este determinată de factori fizico-chimici dintre antigen și anticorp care duc la deformarea complexului, demascarea zonelor hidrofobe sau mascarea zonelor hidrofile cu excluderea moleculelor de apă (teoria ocuziunii).



Reacțiile antigen-anticorp sînt reversibile. Disocierea acestor complexe imune se realizează prin mijloace nespecifice care folosesc variația temperaturii, a forței ionice sau a pH-ului. În cazuri speciale se pot aplica mijloace specifice de deplasare a antigenului din complex cu ajutorul haptenelor.

Dintre toate aceste metode disocierea prin variațiile pH-ului este metoda cea mai larg aplicată. Complexele imune sînt stabile între limite mari de pH 4,5—11. Disocierea este mai avansată la pH-uri extreme 2,4—11,3 și are loc atît la complexele anticorpilor cu antigenele proteice cît și cu cele polizaharidice. Utilizarea soluțiilor acide în comparație cu soluțiile alcaline este mai avantajoasă deoarece ei provoacă disocierea complexelor imune fără a altera prea mult activitatea anticorpilor.

Indiferent de procedeul folosit pentru disociere, din cantitatea totală a anticorpilor din complexele respective se pune în libertate numai o parte, iar funcția anticorpilor este parțial alterată.

O condiție principală în procesul de disociere o constituie faptul că disocierea trebuie efectuată pe precipitate imune proaspăt preparate.

Operația de separare a anticorpilor de antigen este simplă dacă antigenul este insolubil, caz în care este suficientă numai o centrifugare. Dacă antigenul este solubil, separarea anticorpilor de antigen este foarte greu de efectuat.

Separarea anticorpilor de antigenele solubile se realizează numai dacă aceste două substanțe au proprietăți fizico-chimice și chimice net deosebite.

Dacă antigenul se deosebește mult de anticorp prin greutate moleculară, separarea se poate efectua cu ajutorul ultracentrifugării sau prin filtrare prin gel de Sephadex.

În cazul în care antigenul se deosebește de anticorp prin semnul sau mărimea încărcăturii electrice, separarea lor poate fi realizată prin electroforeză sau cromatografie pe schimbători de ioni. Aceste ultime metode nu sînt aproape folosite.

Datorită avantajelor pe care le prezintă utilizarea antigenelor insolubile la separarea anticorpilor, au fost elaborate metode de insolubilizarea antigenelor prin fixarea lor pe suporturi insolubile fără pierderea proprietăților imunologice. Aceste substanțe cu proprietatea de a adsorbi antigenele se numesc imunosorbente. Printre cei folosiți se numără: colodiu, caolin, cărbune, perle de sticlă, gel de hidroxid de aluminiu, poliacrilamida, glutaraldehida.

Antigenele și anticorpii (imunoglobulinele) sînt produse imunologice care prin proprietățile pe care le dețin sînt folosite:

#### I. Ca preparate imunologice în terapie:

Antigenele sînt folosite în imunizarea activă

Anticorpii sînt folosiți în imunizarea pasivă.

În afară de acestea există și o altă categorie de preparate imunologice și anume preparatele imunoreglatoare care nu acționează nici ca antigen nici ca anticorp, ele intensifică sau inhibă mecanismul răspunsului imun.

Clasificarea acestor preparate:

##### 1. Preparat care conțin anticorpi:

a) seruri anti-umane și animale;

b) imunoglobuline umane și animale;

c) imunoglobuline specifice umane și animale;

d) imunoglobuline imunosupresoare (antiRhD) și animale (anti-limfocitare).

Preparatele care conțin anticorpi heterologi sînt din ce în ce mai puțin întrebuințate deoarece provoacă sensibilizare la om.

Preparatele biologice imunosupresoare sînt superioare celor chimioterapeutice. În cazul administrării, preparatele chimioterapeutice blochează nediferențiind celulele formatoare de anticorpi, de cele importante pentru organism.

2. Preparate care conțin antigene:

a) vaccinuri bacteriene și virale

3. Preparate imunoreglatoare:

a) adjuvanți (imunostimulatori);

b) mediatorii ai imunității celulare:

— factorul de transfer

— interferonul

c) sistemul complement: intervine în reacția antigen-anticorp favorizînd liza celulei. Prin inhibarea complementului anticorpii umorali față de un transplant nu pot distruge celulele transplantate. De asemenea, în anemia autohemolitică, anticorpii eritrocitari nu acționează dacă complementul este inhibat prin tratare cu heparină.

## II. Ca reactivi în reacțiile de precipitare (metode imunochimice).

Dintre metodele de punere în evidență *in vitro* a reacției antigen-anticorp cităm:

— *Metode de precipitare* în mediu lichid (soluții saline, tampon);  
în mediu solid (gel de agar, agaroză), caz în care devin reacții de difuziune, antigenul cît și anticorpul se află în formă solubilă;  
în celule (imunofluorescența).

— *Metode de aglutinare și hemaglutinare* în care anticorpii reacționează cu antigenele de pe suprafața unor particule (bacterii, hematii etc.) producînd agregarea acestora.

— *Metode de imunocitoliză și hemoliză* în care prin legarea anticorpului pe suprafața bacteriilor sau hematiilor are loc liza acestora prin activarea componentelor sistemului corespunzător.

— *Metode de fixare a complementului* în care acesta fixat pe complexul antigen-anticorp este pus în evidență indirect prin absența hemolizei sistemului indicator (ser anti-hematii oaie-hematii oaie).

## METODE DE PRECIPITARE

Formarea precipitatului imun depinde de:

— calitatea antigenului (greutatea moleculară, numărul și poziția determinantilor antigenici);

— calitatea anticorpilor (tipul, heterogenitatea, aviditatea și de asemenea de starea moleculei anticorpului sau de fragmentele ei);

— concentrarea componentilor (exces de antigen, echivalență, exces de anticorpi);

— temperatură, concentrația salină, pH-ul mediului de reacție.



### **Precipitarea în mediul lichid**

Precipitarea în mediul lichid permite atât compararea caracterului antigenic global al diferitelor preparate biologice cât și determinarea concentrației anticorpilor în antiser (metoda Uhlenhuth, metoda Ferreira).

Concentrația anticorpilor în antiser se determină prin metoda inelului, punând într-o serie de tuburi o cantitate constantă de anticorpi la care se adaugă diluțiile succesive de antigen. Tuburile astfel pregătite sunt plasate la 37°C pentru 15—30', timp în care are loc reacția de precipitare.

Apoi se scot și se stabilește până la ce limită de diluție a antigenului, serul anti este capabil să precipite. Această diluție limită se numește titrul antiserului care se notează printr-un raport având cifra 1 ca numărător și diluția ca numitor (ex. 1/10 000).

### **Precipitarea în mediul solid**

Precipitarea în mediul solid permite determinarea eterogenității antigenelor sau a anticorpilor (metoda dublei difuziuni și a difuziei radiale simple).

Mediul solid folosit în acest scop este gelul de agar sau agaroză. Agarul este un polizaharid acid format din două componente distincte: agaropectina și agaroză. Agaroză este elementul principal constituit din resturi de 2,3-anhidric-L-galactoză legate alternativ cu agaropectina. Agaroză nu conține grupări acide, de aceea este mediul ideal pentru imunodifuzie.

Prin difuzie se înțelege fenomenul de pătrundere a moleculelor unei substanțe în masa unei alte substanțe datorită mișcărilor de agitație termică.

Fenomenul de difuzie în mediul gelificat depinde în primul rând de diametrul porilor gelului în care are loc difuzia. Cu cât concentrația gelului va fi mai mare, cu atât porii vor fi mai mici și cu atât mai mult gelul va opune o rezistență mai mare la difuzia moleculelor mari. În consecință, o substanță cu greutate moleculară va difuza mai lent prin masa de gel într-o concentrație obișnuită.

Fenomenul difuziei în gel este comun metodelor imunochimice care sunt:

- imunodifuzia simplă unidimensională (Oudin, 1946);
- imunodifuzia simplă radială (Petrie, 1932, Feinberg, 1957—1968, Mancini, Carbonara, Heremans, 1965, Fahey, 1963, Waerman, 1969, Becker, 1969, Reimer, 1970);
- imunodifuzia dublă unidimensională (Oakley, Fulthorpe, 1953);
- imunodifuzia dublă bidimensională (Elek, 1948, Ouchterlony, 1948);
- imunoelectroforeza (Grabar și Williams, 1953, Scheidegger, 1966);
- imunoelectroforeza încrucișată (Laurell, 1965);
- contraimunoelectroforeza (Bussard, 1959);
- electroimunodifuzia (Laurell, 1966).

### **Difuzia simplă**

Este o metodă în care numai unul din reactanți aflat în fază lichidă difuzează într-un mediu solid în care este înglobat, stabilizat, imobilizat celălalt reactant (fig. 17). De obicei, reactantul în fază lichidă se află în mare exces.

Metoda se poate aplica:

— în tuburi — imunodifuzia simplă unidimensională — (nefolosită în prezent în practica curentă datorită consumului unor cantități mari de reactivi);

— pe plăci — imunodifuzia radială simplă (IDRS) — folosită pentru determinări cantitative. Reacția poate fi realizată în două variante prin înglobarea anticorpului (metoda directă) sau prin înglobarea antigenului (metoda

indirectă). În această metodă cel puțin unul din reactanți trebuie să fie în formă pură (de obicei anticorpul monospecific). Aria de precipitare finală (haloul) este determinată numai de raportul exact al concentrației de antigen care difuzează și de anticorpii care sînt înglobați. Mărimea ariei este direct proporțională cu concentrația antigenului care difuzează și invers proporțională cu concentrația anticorpului înglobat și cu înălțimea stratului de gel. Concentrația anticorpului înglobat trebuie aleasă în funcție de titrul său și nivelul concentrației antigenului care trebuie determinat pentru a obține o mărime convenabilă a zonelor de precipitare și un contur bine delimitat al acestora. Concentrația antigenului folosit nu trebuie să depășească capacitatea de legare a anticorpului înglobat, proteinele concentrate trebuind diluate. S-a observat existența unei relații lineare între concentrația antigenului și diametrul zonei de precipitare și la timpuri parțiale de difuzie. Această difuzie parțială în condiții standardizate este folosită în practica curentă a determinărilor concentrațiilor proteinelor plasmatice. Determinarea cantitativă se face prin comparație cu o scară etalon, stabilită prin măsurarea zonelor de precipitare la 3 diluții ale antigenului de referință.

#### Difuzia dublă

Este o metodă în care ambii reactanți difuzează într-un mediu care inițial nu-i conține pe nici unul dintre ei (fig. 17). Tehnica se aplică în scopuri cantitative:

— în tuburi — imunodifuzia dublă unidimensională — (mai puțin folosită în practică);

— pe lame și plăci — imunodifuzia bidimensională. Precipitatul apare sub forma unei linii, la punctul de întâlnire a celor două componente (antigen-anticorp).

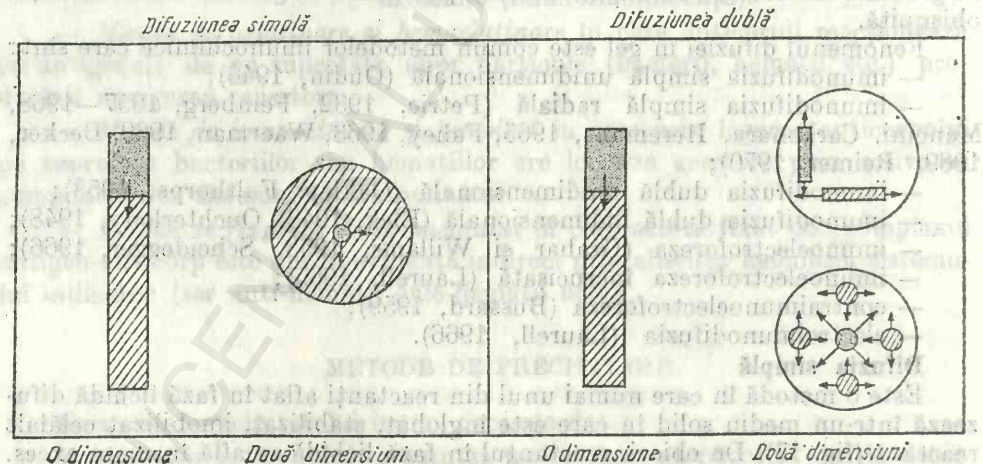


Fig. 17. — Sisteme de difuziune.

Numărul liniilor de precipitare la sistemele de difuzie simplă sau dublă e corelat aproximativ cu numărul sistemelor precipitante prezente, formîndu-se o linie pentru fiecare pereche de antigen-anticorp.

Poziția și forma liniilor este în funcție de raportul dintre greutatea moleculară a antigenului și a anticorpului. În cazul în care antigenul și anticorpul



au o greutate moleculară asemănătoare, banda de precipitare la mijlocul distanței dintre orificii este dreaptă. În cazul în care antigenul are greutatea moleculară mai mare (deci constantă de difuziune mai mică) banda de precipitare va fi curbă, spre orificiul antigenului.

În cazul în care antigenul are o greutate moleculară mai mică decât anticorpul (deci constantă de difuziune mai mare), banda de precipitare va fi curbată spre orificiul anticorpului (fig. 18 a).

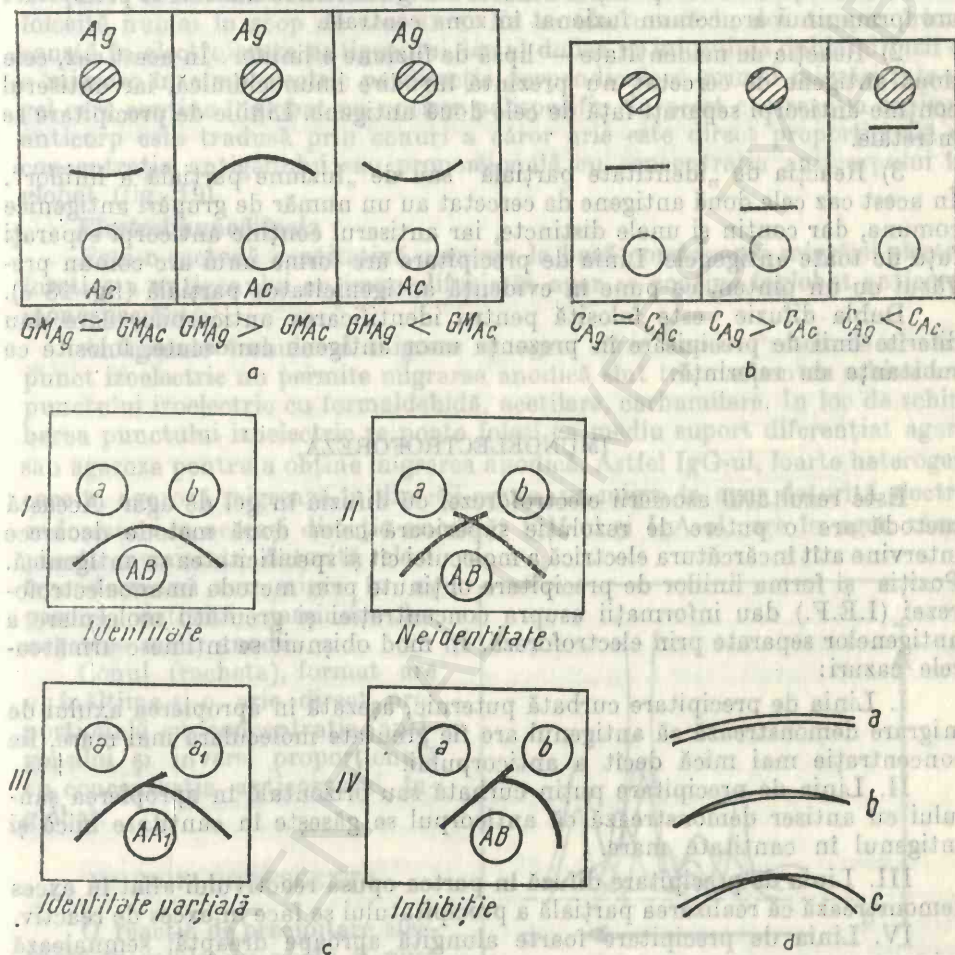


Fig. 18. —

a) Formarea liniilor de precipitare în raport cu greutatea moleculară a Ag (antigenului) și Ac (anticorpului). b) Poziția liniilor de precipitare în raport cu concentrația reactanților. c) Dublă difuzie — tipurile de reacție de precipitare a, a<sub>1</sub> — antigen; AB, AA<sub>1</sub> — anticorp. d) Liniile de precipitare suprapuse. a = componente cu aceeași mobilitate electroforetică; b = exces de anticorp; c = exces de antigen.

În concluzie: banda sau linia de precipitare se curbează spre componenta cu greutate moleculară mai mare. Dacă antigenul se găsește în exces, banda de precipitare se va dizolva în partea orientată spre orificiul încărcat cu antigen și se va forma mai aproape de anticorp. Linia de precipitare va fi deplasată

de la antigen spre anticorp. În cazul în care anticorpul se găsește în exces, fenomenul este invers (fig. 18 b).

Examinarea formei și poziției liniilor de precipitare, a condus la obținerea de date asupra identității sau înrudirii antigenelor de comparat. Se pot întâlni următoarele situații principale:

1) Reacția de identitate — fuziune completă a liniilor.

În acest caz, cele două antigene de cercetat sînt complet identice, iar antiserul conține anticorpi față de aceste antigene comune. Linia de precipitare are forma unui arc comun fuzionat în zona centrală.

2) Reacția de neidentitate — lipsă de fuziune a liniilor. În acest caz, cele două antigene de cercetat nu prezintă înrudire imunochimică, iar antiserul conține anticorpi separați față de cele două antigene. Liniile de precipitare se întretaie.

3) Reacția de „identitate parțială” sau de „fuziune parțială a liniilor”. În acest caz cele două antigene de cercetat au un număr de grupări antigenice comune, dar conțin și unele distincte, iar antiserul conține anticorpi separați față de toate antigenele. Linia de precipitare are forma unui arc comun prevăzut cu un pînten, ce pune în evidență antigenicitatea parțială (fig. 18 c).

Dubla difuzie este folosită pentru identificarea anticorpilor care dau diferite linii de precipitare în prezența unor antigene cunoscute, folosite ca substanțe de referință.

## IMUNOELECTROFOREZA

Este rezultatul asocierii electroforezei cu difuzia în gel de agar. Această metodă are o putere de rezoluție superioară celor două metode deoarece intervine atât încărcătura electrică a moleculei cit și specificitatea sa antigenică. Poziția și forma liniilor de precipitare obținute prin metoda imuno-electroforezei (I.E.F.) dau informații asupra concentrației și greutatei moleculare a antigenelor separate prin electroforeză. În mod obișnuit se întâlnesc următoarele cazuri:

I. Linia de precipitare curbată puternic, așezată în apropierea axului de migrare demonstrează că antigenul are fie greutate moleculară mai mare, fie concentrație mai mică decît a anticorpului.

II. Linia de precipitare puțin curbată sau orizontală în apropierea șanțului cu antiser demonstrează că anticorpul se găsește în cantitate mică și antigenul în cantitate mare.

III. Linia de precipitare difuză în partea opusă reactivului aflat în exces demonstrează că realizarea parțială a precipitatului se face în exces de reactiv.

IV. Linia de precipitare foarte alungită aproape dreaptă, semnalează existența unor componente cu o mobilitate electroforetică diferită dar cu aceeași specificitate imuno-chimică.

V. Linia de precipitare curbată semnalează prezența unor componente cu mobilitate electroforetică diferită, dar cu specificitate imunochimică identică.

VI. Liniile de precipitare alăturate, duble sau triple. Se pune în evidență existența mai multor componente cu diferite mobilități electroforetice ceea ce înseamnă că serul imun nu poate decela diferențe în constituția lor. Se recomandă schimbarea serului imun.



VII. Linii de precipitare suprapuse (fig. 18 d). În cazul că liniile sînt paralele și se formează simultan, componentele au aceeași mobilitate electroforetică dar o specificitate antigenică diferită (a). Acest caz trebuie diferențiat de situațiile în care un singur component, poate da două linii de precipitare suprapuse dar cu capetele unite în exces de anticorp (b) sau unite prin mijlocul curburii în exces de antigen (c).

### Imunoelectroforeza încrucișată

Este o metodă cantitativă, o variantă a metodei de imunoelectroforeză folosită numai în scop de cercetare. Ea se efectuează în doi timpi: primul constă în electroforeza antigenului, iar al doilea în înlocuirea dublei difuzii cu o migrare în cîmp electric pe direcție perpendiculară primei migrări într-un gel care conține înglobat un antiser polispecific. În acest caz reacția antigen-anticorp este tradusă prin conuri a căror arie este direct proporțională cu concentrația antigenului sau proporțională cu concentrația anticorpului înglobat (fig. 19).

### Electroimunodifuzia

Este o metodă cantitativă care are la bază combinarea migrării electroforetice a antigenului cu imunodifuzia în agar ce conține înglobat anticorpii monospecifici.

Antigenele trebuie să migreze omogen către anod. Proteinele al căror punct izoelectric nu permite migrarea anodică sînt tratate pentru schimbarea punctului izoelectric cu formaldehidă, acetilare, carbamilare. În loc de schimbarea punctului izoelectric se poate folosi ca mediu suport diferențiat agarul sau agaroză pentru a obține migrarea anodică. Astfel IgG-ul, foarte heterogen, care în agaroză migrează în direcții opuse, va migra în agar datorită electroendosmozei în aceeași direcție anodică. IgM-ul și IgA-ul care în agar rămîn practic nemîșcate datorită electroendosmozei vor migra în agaroză datorită sarcinilor lor negative mici, anodice.

Conul (racheta), format are o înălțime și o arie direct proporțională cu concentrația antigenului și invers proporțională cu concentrația anticorpului înglobat.

### IMUNOFLUORESCENȚĂ

O reacție de precipitare efectuată în celule nu poate fi pusă în evidență cu ochiul liber, dar nici cu microscopul. Dacă de moleculele anticorpilor se atașează o substanță fluorescentă atunci microprecipitatul manifestă o fluorescență caracteristică în lumina ultravioletă, care poate fi pusă în evidență cu microscopul de fluorescență.

Procedeele folosite în fluorescență pentru localizarea antigenelor specifice sînt două: procedeul direct și procedeul indirect.

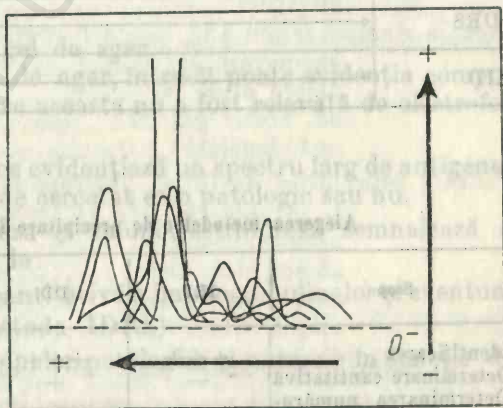


Fig. 19. — Imunoelectroforeza încrucișată.

I. Procedeu direct constă în aplicarea anticorpilor fluorescenți peste preparatul microscopic care conține antigenul studiat.

II. Procedeu indirect (procedeu sandwich) este constituit din două etape. Prima etapă constă în tratarea preparatului microscopic cu anticorpul specific nemarcat. A doua etapă constă în tratarea imunoprecipitatului format în prima etapă cu anticorpul fluorescent preparat față de anticorpul specific nemarcat; de fapt este folosit nu numai pentru identificarea și localizarea antigenului dar și pentru identificarea anticorpilor specifici în celule. Imunoprecipitarea cu anticorpi fluorescenți prezintă o mare sensibilitate și specificitate și totodată permite localizarea în celule a celor doi componenți (anticorp-antigen).

Metodele imunochimice frecvent folosite în laboratorul clinic (tab. LXXIV și LXXV) sint enumerate mai jos:

Tabelul LXXIV

Sensibilitatea metodelor imunochimice de precipitare în gel și domeniile lor de aplicare

| Metoda de<br>pp în gel | Sensibilitatea în mg/ml, µg/ml sau ng/ml |       |      |    |    |    |   |   |     |      |    |        |
|------------------------|------------------------------------------|-------|------|----|----|----|---|---|-----|------|----|--------|
|                        | 100 mg                                   | 10 mg | 1 mg | 30 | 10 | µg | 5 | 3 | 1,5 | 1 µg | 30 | 100 ng |
| IEF                    | ←                                        |       | ↑    | ↑  | ↑  | ↑  | ↑ | ↑ | ↑   | ↑    | ↑  | ↑      |
| DD                     | ←                                        |       |      | ●  | ●  | ●  | ● | ● | ●   | ●    | ●  | ●      |
| CIEF                   | ←                                        |       |      |    |    |    |   |   |     |      |    |        |
| IDRS                   | ←                                        |       |      |    |    | ●  | ● | ● | ●   | ●    | ●  | ●      |
| EID                    | ←                                        |       |      |    |    |    |   |   |     | ●    | ●  | ●      |

Tabelul LXXV

Alegerea metodelor de precipitare în funcție de scopul urmărit

| Scop                                   | IEF | DD  | CIEF | IDRS | EID |
|----------------------------------------|-----|-----|------|------|-----|
| Identificarea                          | +++ | +++ | +    | +    | +   |
| Determinare cantitativă                | —   | +   | —    | +++  | ++  |
| Determinarea numărului de constituenți | +++ | ++  | —    | —    | —   |

#### I. Metode calitative:

- dubla difuzie (DD)
- imunoelectroforeza (IEF)
- contraimunoelectroforeza (CIEF)
- imunofluorescența (IF).



## II. Metode semicantitative:

- precipitarea în tub (PT)
- precipitarea în tub capilar (PTC)
- precipitarea pe lamă (PL)

## III. Metode cantitative:

- imunodifuzia radială simplă (IDRS)
- electroimunodifuzia (EID)
- testul antiglobulinic (vezi capitolul Hematologie)
- testul de inhibare a hemaglutinării (vezi capitolul Hematologie).

## CONDUITA DE LABORATOR PRIVIND APLICAREA TESTELOR IMUNO-CHIMICE ÎN LABORATORUL CLINIC

### Etapă I — (etapă orientativă)

#### Analize de screening:

- VSH
- Proteinemie
- Teste de disproteinemie
- Sumar de urină.

În cazul în care aceste teste pun în evidență valori anormale se trece la efectuarea altor teste ce alcătuiesc etapa II de lucru.

### Etapă II — (etapă de precizare a diagnosticului de laborator).

#### Analize chimice, fizico-chimice și imunochimice:

- Fibrinogen
- Crioglobuline
- Reacția Sia
- Electroforeza pe hîrtie sau gel de agar.

Se preferă electroforeza în gel de agar, întrucît poate evidenția componenta monoclonală în cazurile în care aceasta nu a fost relevată de electroforeza pe hîrtie.

a. Imunoelectroforeza, metodă ce evidențiază un spectru larg de antigene, putîndu-se spune uneori dacă serul de cercetat este patologic sau nu.

În cazurile în care electroforeza și imunoelectroforeza semnalează o modificare a globulinelor se recurge la:

f. Imunogramă, determinarea cantitativă a imunoglobulinelor și eventual a lanțurilor kappa și lambda (metoda IDRS).

g. Teste pentru decelarea proteinelor patologice și normale în funcție de tabloul clinic:

- proteină C reactivă
- alfa<sub>2</sub> fetoproteină
- antigen HBs
- factor reumatoid
- complement

#### Reactivi:

Cîteva dintre reactivii comuni folosiți pentru efectuarea acestor metode sînt:

1) tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,05

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| barbiturat de Na (veronal sodic)     | 10 g     |
| acid dietilbarbituric (veronal acid) | 1,5 g    |
| apă distilată                        | 1 000 ml |
| merthiolat de sodiu                  | 0,1 g    |

Substanțele cîntărite sînt dizolvate în 800 ml apă distilată la cald (B.M.).

După dizolvare, se adaugă 0,1 g merthiolat de sodiu, se completează volumul de apă distilată la 1 000 ml. Tamponul poate fi păstrat la +4°, 5—10 luni.

2) Gel de agar 1 % în tampon veronal, pH 8,6 f.i. 0,025

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| agar special Noble Difco       | 10 g   |
| apă distilată                  | 500 ml |
| tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,1 | 500 ml |
| merthiolat de sodiu            | 0,1 g  |

După ce agarul a fost lăsat în apă distilată 24 ore la temperatura laboratorului, se adaugă tampon veronal și se pune la fiert 10' în bain-marie, se lasă 30 minute. Apoi se filtrează prin vată sau sită de mătase, se repartizează în tuburi de circa 10—15 ml și pentru a nu se evaporă tuburile cu agar sînt astupate cu dopuri de cauciuc. În momentul întrebuițării tuburile se introduc în bain-marie la fierbere și se lichefiază. Nu se recomandă ca același tub de geloză să fie încălzit de mai multe ori.

3) Soluție de colorare:

— Azocarmin B 1‰.

|                     |         |
|---------------------|---------|
| azocarmin B         | 1 g     |
| acid acetic glacial | 28,2 g  |
| acetat de sodiu     | 3,69 g  |
| apă distilată       | 900 ml  |
| glicerină           | 100 ml. |

Soluția de azocarmin 1‰ poate fi preparată și astfel:

|                    |         |
|--------------------|---------|
| azocarmin B        | 1 g     |
| alcool etilic 96°  | 450 ml  |
| ac. acetic glacial | 50 ml   |
| apă distilată      | 500 ml. |

Filtrare prin hîrtie de filtru, păstrare la temperatura laboratorului.

— Amidoschwartz 1‰:

|                     |         |
|---------------------|---------|
| amidoschwartz       | 1 g     |
| alcool etilic 96°   | 450 ml  |
| acid acetic glacial | 50 ml   |
| apă distilată       | 500 ml. |

4) Seruri anti-proteine plasmatiche umane poli și monospecifice.

Aceste seruri sînt reactivi imunochimici obținuți prin imunizarea animalelor cu antigene proteice normale sau patologice.

Antiserurile polispecifice conțin anticorpi față de un mare număr de antigene proteice plasmatiche pe care le evidențiază prin metode ca: imuno-electroforeza sau reacția de precipitare în tub (metoda Uhlenhuth).

Serurile monospecifice conțin anticorpi față de o singură proteină plasmatică normală sau patologică și sînt folosite în metoda difuziei duble, metodă calitativă de identificare și în special în imunodifuzia radială simplă, metodă cantitativă de determinare a proteinelor plasmatiche.



Heterogenitatea antigenelor poate imprima serurilor antiproteine plasmatice proprietăți diferite ce se manifestă fie ca proprietăți precipitante în mediu lichid sau geloză, fie ca proprietăți hemaglutinante.

Proprietățile precipitante în mediu lichid în care au un rol important anticorpii anti  $\beta$ -globuline, nu implică proprietăți precipitante în gel sau proprietăți hemaglutinante asigurate de anticorpii anti imunoglobulinici. De asemenea, prezența unei proprietăți nu exclude pe celelalte două.

În funcție de aplicabilitate și proprietăți, serurile anti proteine plasmatice umane și animale din 1968 (89) au fost clasificate în:

- seruri precipitante (poli și monospecifice) în gel;
- seruri precipitante în mediul lichid;
- seruri hemaglutinante.

În vederea localizării și identificării antigenelor intra- și extracelulare sau pentru mărirea sensibilității metodelor imunochimice s-a trecut la marcarea serurilor anti proteine plasmatice umane cu izotiocianat de fluoresceină sau izotopi. Folosirea acestor seruri necesită aparatură specială ca: microscop pentru fluorescență și contor Geiger-Müller.

## METODE IMUNOCHIMICE APLICATE ÎN LABORATORUL CLINIC

### METODE CALITATIVE

#### DUBLA DIFUZIE (DD)

#### METODA OUCHTERLONY

Metoda se recomandă în special pentru identificarea proteinelor patologice ca: produșii de degradare ai fibrinogenului, proteina C reactivă, alfa<sub>1</sub> fetoproteina, antigenul Australia, IgE, IgD (în ser), kapa și lambda (în urină) pentru hemoglobina fetală (în soluții de hematii lacate).

#### Material și reactivi

1. Lame de microscop 2,5/7,5 mm.
2. Gel de agar 1% în tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,025
3. Stanțe pentru godeuri
4. Ser uman de cercetat (antigen)
5. Ser antiproteină plasmatică umană (anticorp)
6. Soluție de spălare (NaCl 8 g‰).
7. Soluție de colorare azocarmin B 1‰.

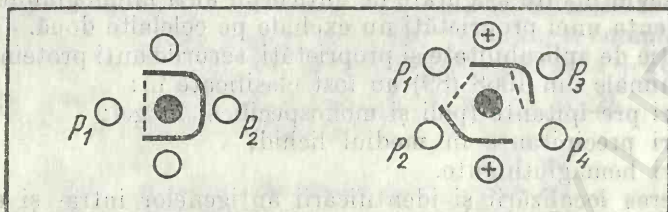
**Modul de lucru:** gelul de agar 1% în tampon veronal pH = 8,6 f.i. 0,025 este turnat fierbinte în cantitățile de 3,5 ml pe lama de microscop.

După gelificare, lama se aplică pe o machetă cu trei rozete desenate pe hirtie milimetrică iar cu o stanță se perforează godeurile. Gelul de godeu este îndepărtat prin aspirare sau este scos cu un ac. Rozetele au un godeu central de 3 mm și 6 godeuri periferice de același diametru situate la o distanță de 2—3 mm de godeul central.

Godeurile periferice se notează de la 1 la 6 pentru fiecare rozetă. Godeurile 1 și 4 se încarcă cu ser martor pozitiv iar celelalte cu serurile de cercetat. În felul acesta fiecare ser de cercetat este învecinat cu ser martor pozitiv ceea ce permite verificarea specificității liniei de precipitare. Pentru o mai mare siguranță unul din godeurile periferice poate fi încărcat cu ser martor negativ.

Godeul central se încarcă cu antiserul. Lamele astfel pregătite se țin în camere umede la 37°C. Citirea rezultatelor se face după 4 ore.

Pozitivitatea reacției se caracterizează prin apariția unei linii de precipitare între godeul central și periferie (fig. 20). Pentru păstrare, lamele se pot spăla, usca și colora (vezi IEF).



- Ser antiproteină umană
- ⊕ Ser de referință (marcator pozitiv)
- Probe de cercetat

Fig. 20. — Dubla difuzie (DD)

$P_1$  — falsă reacție (negativ);  $P_2$  — pozitiv;  $P_3$  — pozitiv și falsă reacție;  $P_4$  — negativ.

## IMUNOELECTROFOREZA (I.E.F.) METODA SCHEIDEGGER

Această metodă este folosită pentru separarea unor constituenți cu mobilitate electroforetică apropiată și care se găsesc în cantități foarte mici.

### Material și reactivi

1. Aparat de electroforeză
2. Lame de microscop (2,5/7,5 cm)
3. Stanțe pentru godeuri și șanțuri
4. Micropipete simple și microsiringi simple și automate
5. Hirtie de filtru (punți de legătură dintre agar și baia de electroforeză).
6. Tampon veronal.

— tampon veronal stoc pH = 8,6 f.i. 0,05

— tampon pentru băile de electroforeză pH 8,6 f.i. 0,025

tampon stoc, f.i. 0,05 ..... 500 ml

apă distilată ..... 500 ml

— tampon veronal după Heremans

tampon veronal stoc, pH = 8,2, f.i. 0,05

barbiturat de sodiu-veronal de sodiu  
sau (Medinal) ..... 9 g

HCl N/1 ..... 6,5 ml

apă distilată ..... 1 000 ml

Tampon pentru băile de electroforeză pH = 8,2, f.i. 0,025

tampon stoc, f.i. 0,05 ..... 500 ml

apă distilată ..... 500 ml

Pentru băi se folosește tampon fără merthiolat de sodiu pentru a evita înnegrirea electrozilor. Conservarea tampoanelor se face la +4°C.

7. Ser uman de cercetat (antigen)

8. Seruri anti-proteine plasmatice umane (anticorpi).



**Modul de lucru:** pentru reacția de imunoelectroforeză se toarnă pe lama de microscop 3,5 ml agar fierbinte 1% în tampon veronal pH = 8,6, f.f. 0,025. După gelificare în mijlocul lamei se face un godeu cu stanță ( $\varnothing$  3 mm); gelul din godeu se scoate cu un ac. Apoi se aplică stanța de o parte și alta a godeului pentru a se realiza două șanțuri, la distanța de 5 mm. Lama pregătită este plasată în aparat, legătura dintre gel și soluția tampon, făcându-se cu punți din hirtie de filtru. Aceste hirtii au 2,6 cm lățime iar lungimea este în raport cu tipul de baie folosit. Pentru o bună desfășurare se folosesc 2 sau 4 hirtii formind o singură punte. Godeul este încărcat cu produsul de analizat 0,005 ml ( $V = 5 \mu$ ), căruia i s-a adăugat albastru de bromfenol. Pentru migrare se reglează aparatul la 0,2 mA/cm (lățimea lamei) și se lasă pînă cînd colorantul (legat de albumină) ajunge la 1 cm de marginea anodică a lamei. Durata migrației este de 4—6 ore, după care aparatul este închis și lamele sînt scoase. Gelul din șanțurile laterale se scoate cu un ac, bisturiu sau prin aspirare. Șanțurile se încarcă cu serul anti-proteine plasmatic polispacific sau monospacific. Pentru difuzia completă lamele sînt introduse într-o cameră umedă (cutie Petri) la 37° timp de 6—18—48 ore, arcurile de precipitare în poziție caracteristică apar în funcție de greutatea moleculară a antigenului de cercetat. Pentru păstrarea imaginii obținute, imunoelectroforezele se pot fotografia ca atare sau se pot colora după spălare și uscare. Pentru îndepărtarea excesului de proteină care nu a intrat în reacție și care în timpul colorației fixează colorantul mascînd zonele de precipitare specifice, este necesar ca placa cu gel de agar să fie plasată timp de 24—48 ore într-o baie cu soluție 8 g‰ NaCl, care conține și 0,1 ml merthiolat cu Na‰ ml soluție.

Înainte de a se introduce lamele în baie, șanțurile și godeurile trebuie să fie încărcate cu soluție de agar 1% în tampon veronal pH = 8,6. Apoi lamele se leagă la capete cu hirtie de filtru 1 cm lățime pentru ca gelul de pe lame să nu se desprindă. Se adsoarbe excesul de lichid cu mai multe hirtii de filtru plasate pe suprafața lamei și se usucă la 80°C cîteva ore tot cu hirtii de filtru aplicate pe suprafața gelului. Lamele uscate se pot colora cu azocarmin B sau amidoschwartz. Placa este introdusă în colorant pentru 1 oră, apoi se spală rapid cu apă de robinet, se tamponează cu hirtie de filtru și se usucă la 37°. Plăcile uscate și colorate se pot păstra timp nelimitat. Analiza imunoelectroforetică în cazul serului normal de om (antigen) față de serul polispacific antiproteine plasmatic umane (anticorp) evidențiază 15—35 componente proteice.

#### A. PROTEINE PLASMATICE UMANE NORMALE

În funcție de cele 5 fracțiuni electroforetice la serul uman normal albuminele, alfa<sub>1</sub>-globuline, alfa<sub>2</sub>-globuline, beta-globuline și gama-globuline, componentele separate electroforetic sînt distribuite după cum urmează:

*În regiunea albuminelor* imunoelectroforetic se diferențiază: prealbuminele și albuminele.

**Prealbuminele.** În acest grup intră prealbuminele și cu o GM = 50 000, concentrație 10—40 mg/100 ml și uneori  $\rho_2$  sau alfa<sub>1</sub> lipoproteina cu poziție modificată prealbuminică în serurile vechi. Aceste proteine au de obicei o viteză de migrare electroforetică mai mare decît a albuminelor. Ele au rolul de a transporta tiroxina și triiodotiroxina din ser. Scăderea concentrației prealbuminelor este întilnită în ciroză iar creșterea este întilnită în nefroză.

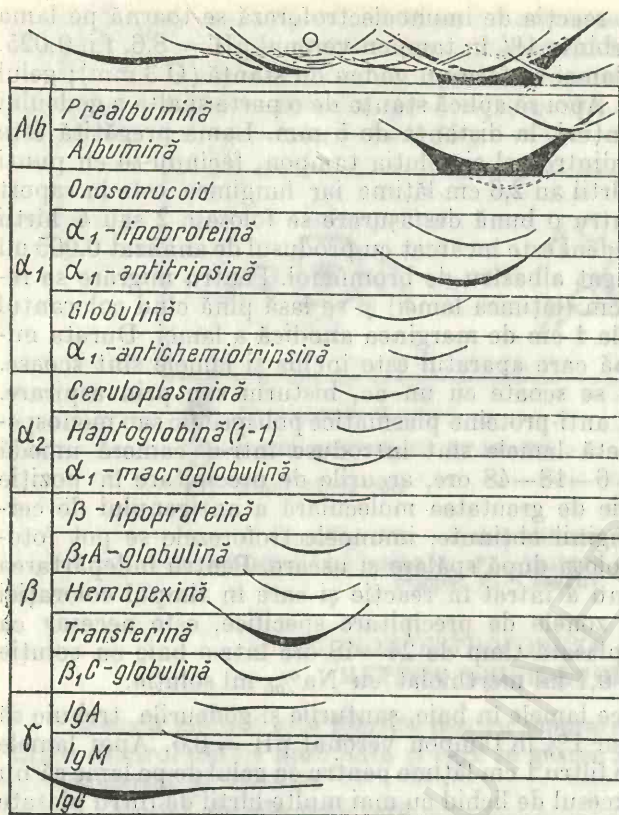


Fig. 21. — Principalele componente proteice dintr-un ser uman normal revelate prin analiza imunoelectroforetică.

**Orosomucoidul** are  $GM = 44\ 100$  și se găsește într-o concentrație de  $55-140\ mg\% \text{ ml}$ , crește de obicei în condițiile de inflamație acută și cronică, în artrite reumatoide și neoplasme. Valori scăzute în cazuri de hepatite, sindroame nefrotice, malnutriție.

**Alpha<sub>1</sub> antitripsina** are  $GM = 54\ 000$  și se găsește într-o concentrație de  $200-400\ mg\% \text{ ml}$ . Este inhibitor al tripsinei și chimotripsinei, crește în condiții inflamatorii, lipsa ei ereditară duce la emfizem pulmonar.

În regiunea alfa, imunoelectroforetic pot fi diferențiate: haptoglobina, ceruloplasmina și alfa<sub>2</sub> macroglobulina.

**Haptoglobina** are  $GM = 100\ 000$  și se găsește într-o concentrație de  $100-330\ mg\% \text{ ml}$ . Are proprietăți peroxidazice și poate lega Hb cu care formează complexe de asemenea cu activitate peroxidazică. Haptoglobina are un polimorfism electroforetic tradus imunoelectroforetic prin apariția a trei linii de precipitare corespunzătoare tipurilor 1-1, 2-1 și 2-2. Este redusă în boli de ficat, anemii hemolitice, crește în stări inflamatorii și necroze tisulare.

**Ceruloplasmina** are  $GM = 132\ 000$  și o concentrație de  $15-60\ mg\% \text{ ml}$ . Leagă Cu și are o activitate oxidazică. Odată cu învechirea serului ceruloplasmina se degradează, arcul de precipitare nemafiind caracteristic. 90% din

**Albumina.** Această proteină prezintă cea mai mare concentrație serică  $3500-5500\ mg\% \text{ ml}$ , fapt ce determină apariția liniei de precipitare la imunoelectroforeză în câteva ore. Are greutatea moleculară egală cu  $65\ 000$  și prezintă o importantă funcție osmotică, este rezerva de proteine a serului și proteina de transport pentru diferiții ioni, pigmenți și hormoni. Descreșterea concentrației sale este frecventă în nefroze, hepatite, ciroze.

În regiunea alfa<sub>1</sub> imunoelectroforetic pot fi diferențiate alfa lipoproteina, anti-tripsina și alfa<sub>1</sub> acid glicoproteic (orosomucoid).

**Alfa<sub>1</sub> lipoproteina** are  $GM = 250\ 000$  și se găsește în serul normal într-o concentrație de  $290-770\ mg\% \text{ ml}$ . Rolul și modificările patologice ale acestei proteine sînt amintite la prealbumină.



conținutul de cupru al plasminei normale (100 mg%/ml) este legat de ceruloplasmină. Valori scăzute pot fi ereditare (boala Wilson) și în stadiile finale ale cirozei ficatului, creșterea ei este asociată cu cazurile de distrugerii celulare intense. Valori crescute: leucemii, nefroze, neoplazii, graviditate.

*Alfa<sub>2</sub> macroglobulina* are  $GM = 820\ 000$  și o concentrație de 150—420 mg% ml. Este un inhibitor de protează (plasmină) și fixează hormonii. Este foarte crescută în sindromul nefrotic și crescută în boli de ficat, diabet. În serul nou-născutului are valori similare cu ale adultului, între 2—4 ani valorile sînt de 2—3 ori mai mari decît ale adultului, iar după 10 ani valorile sînt egale cu cele ale adultului.

În regiunea beta imunoelectroforetic pot fi diferențiate beta lipoproteina, siderofilina sau transferina, hemopexina și complementul.

*Beta lipoproteina* are  $GM = 2\ 400\ 000$  și o concentrație de 220—600 mg% ml, în funcție de vîrstă. Este o lipoproteină serică cu densitate scăzută (proteină „low density“), crește în stări hiperlipemice și nefroză. Are rol de transportor al lipidelor (colesterol, hormoni etc.).

*Siderofilina* (transferina) are o  $GM = 80\ 000$  și o concentrație de 200—400 mg% ml. Fixează și transportă Fe. O moleculă de siderofilină leagă 2 ioni de fier trivalent, fenomen ce depinde de pH-ul mediului. În condiții normale 1/3 din siderofilina serică este legată de fier și 99% din fierul seric este legat de siderofilină. Ca rol biologic i se atribuie în afară de legarea fierului, neutralizarea excesului de fier ionic în anumite condiții patologice, tamponarea fierului, menținerea unei rezerve de fier și prevenirea excreției de fier prin urină. Este scăzută în nefroze și neoplasme și este foarte ușor crescută în infecții acute, anemii cronice feriprivate, hepatite acute (în faza de început) și fiziologic în sarcină.

Determinarea cantitativă a siderofilinei are o mare importanță pentru diagnostic mai ales în patologia renală. Indicele de selectivitate obținut din raportarea valorilor clearance-ului Ig G la clearance-ul siderofilinei informează despre originea unei proteinurii și diferențiază proteinuriile prin mecanism glomerular de cele prin mecanism tubular.

*Hemopexina* are o  $GM = 57\ 000$  și o concentrație de 50—150 mg % ml. Fixează hemul din Hb. O moleculă de hemopexină leagă 15—20 molecule de hem. Este scăzută în anemii hemolitice și alte hemoglobinopatii cu hemoliză intensă.

*Complementul C<sub>3</sub>*, sau  $\beta_{1C}$  globulina, prezent în serul proaspăt este o glicoproteină cu activitate hemolitică. Are  $GM = 185\ 000$  și o concentrație de 55—120 mg% ml. C<sub>3</sub> se poate transforma in vivo în mai multe componente cum ar fi C<sub>3a</sub> (anafilatoxina), C<sub>3d</sub> (alfa<sub>2</sub>D-globulina) etc. În serurile învechite C<sub>3</sub> sau  $\beta_{1C}$  se transformă în  $\beta_{1A}$  globulină fără activitate hemolitică. Datorită antigenității comune în serurile învechite apar ambele componente. Este scăzut în boli autoimune (lupus eritematos), glomerulonefrite acute, boala serului, hepatite cronice, anemii hemolitice. Este crescut în infecții acute, neoplasme, afecțiuni ale țesutului conjunctiv.

Determinarea cantitativă se face serologic pe ser proaspăt sau imunochimic pe ser conservat.

Determinarea cantitativă a C<sub>3</sub> prin metoda imunochimică furnizează rezultate concordante cu cele obținute prin metoda imunohemolizei 50%, cu excepția a rare cazuri de glomerulonefrită la care se poate găsi un C<sub>3</sub> nor-

mal imunochimic dar un complement scăzut prin metoda imunohemolizei (această metodă apreciind mai multe componente ale complementului).

În regiunea gama se diferențiază imunoelectroferetic: imunoglobulina G (IgG,  $\gamma$ G,  $\gamma$ G-globulina), imunoglobulina M (IgM,  $\beta_2$ M-globulina) și imunoglobulina A (IgA sau  $\beta_{2A}$ -globulina. Caracterizarea acestora, vezi Addendum.

Tot în această zonă mai există și alte fracțiuni ca  $\beta_{2B}$  și  $\beta_{2C}$  a căror natură nu este pe deplin elucidată.

Globulinele M și A pot avea și polimeri. În general, în cazul serurilor normale electroforetic, imunoglobulinele A și M nu se pot diferenția de IgG, ele formînd un singur spot gamaglobulina.

Concentrația imunoglobulinelor în serul uman normal variază mult de la simplu la dublu și chiar triplu. Ele variază de asemenea în funcție de vîrstă, sex, rasă și zonă geografică.

Globulinele G, A, M sînt purtătoare de anticorpi și se numesc imunoglobuline (Ig); cantitatea majoră de anticorpi o deține IgG. Din grupul Ig mai fac parte IgE și IgD dar care nu apar la imunoelectroforeză datorită concentrației lor serice foarte mici. Variațiile patologice ale Ig în difere afecțiuni vezi tabelul LXXVI.

## B. PROTEINE PLASMATICE UMANE PATOLOGICE (vezi „Addendum“)

### CONTRAIMUNOELECTROFOREZA (C.I.E.F.), METODA BUSSARAD

Metoda folosită pentru identificarea rapidă (30—90 minute) a unor proteine cu migrare anodică (ex. : alfa<sub>1</sub>-fetoproteină, antigen Australia) accelerîndu-se viteza de difuzie sub acțiunea unui cîmp magnetic electric.

#### *Material și reactivi*

1. Aparatul de electroforeză
2. Lame de microscop 2,5/7,5 cm
3. Ștanțe pentru godeuri și șanțuri
4. Micropipete sau microsiringi simple sau automate
5. Gel de agar 1% în tampon veronal pH 8,6 f.i. 0,05
6. Ser uman de cercetat (antigen)
7. Ser antiproteine plasmatiche umane (anticorp)
8. Hîrtie de filtru, pentru legătura dintre agar și tamponul din cava aparatului de electroforeză.
9. Soluție de spălare NaCl 8 g‰.
10. Soluție de colorare azocarmin B 1‰.

*Modul de lucru:* gelul de agar 1% în tampon veronal pH = 8,6 f.i. = 0,025 este turnat fierbinte în cantitate de 3 ml pe lamele de microscop. După gelificare, conform schemei alăturate, se fac 3 grupări de cîte 6 godeuri cu Ø 3 mm, gelul este scos din godeuri prin aspirare sau cu un ac, iar lamele sînt plasate apoi în aparatul de electroforeză. Godeurile de la anod se încarcă cu antiserul iar cele de la catod, cu serul de cercetat. Pe fiecare lamă, unul din godeuri se încarcă obligatoriu cu un ser martor pozitiv. Se face legătura dintre gel și tampon cu hîrtie de filtru, se deschide redresorul și se reglează amperajul la 0,4 mA/cm lățime. Durata migrării este de 30—90 minute.



## Variațiile patologice ale Ig în diferite afecțiuni

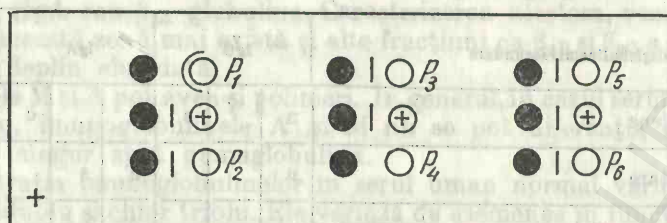
| Disglobulinemii secundare    | IgG |   | IgA |   | IgM |   |
|------------------------------|-----|---|-----|---|-----|---|
| Infecții bacteriene          | n   | c | n   | c | n   | c |
| Infecții parazitare          | n   |   | n   | s |     | c |
| Infecții fungice             | n   |   | n   | c | n   |   |
| Infecții virale              |     | c |     | s |     | s |
| Boli de ficat: ciroze        |     | c |     | c | n   | c |
| ciroze biliare               |     | c |     | c | n   | c |
| hepatite                     |     | c | n   | c | n   | c |
| Boli renale                  |     | s |     | s | n   |   |
| Boli de colagen: lupus       |     | c | n   | c | n   | c |
| artrită                      | n   | c | n   | s | n   | c |
| Hodgkin                      | n   | s | n   | s | n   | c |
| Boli de singe: leucoze acute |     |   |     |   |     |   |
| leucoze cronice              |     | s |     | s |     | s |
| Disglobulinemii primare      |     |   |     |   |     |   |
| — Monoclonal:                |     |   |     |   |     |   |
| G                            |     | c | n   | s |     | s |
| Mielom: A                    | n   | s |     | c | n   | s |
| Bence-Jones                  |     | s |     | s |     | s |
| — Policlonal                 |     | c |     | c | n   | s |
| Waldenström                  | n   | s | n   | s |     | c |

N = normal (n)

S = scăzut (s)

C = crescut (c).

Apariția liniei de precipitare în acest timp confirmă prezența antigenelor cu migrare anodică. Figura 22 reprezintă rezultatele metodei de contraimunoelectroforeză.



- Ser antiproteină umană
- ⊕ Ser de referință (martor pozitiv)
- Probe de cercetat

Fig. 22. — Contraimunoelectroforeza (CIEF).  
P<sub>1</sub> — negativ, falsă reacție; P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> — pozitive; P<sub>4</sub> — negativ; P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub> — pozitive

#### TEHNICA IMUNOFLUORESCENȚEI (METODA COONS)

Se folosește tehnica indirectă (sandwich).

Serul de bolnav se pune în contact cu un substrat antigenic pentru fixarea anticorpilor specifici prezenți în ser.

Urmează incubarea preparatului cu ser anti-globulină umană marcat cu izotiocianat de fluoresceină, care vizualizează în lumină ultravioletă reacția antigen-anticorp.

##### Material

Lampă de ultraviolete HBO<sub>200</sub> cu un sistem de filtrare. Se recomandă următoarea combinație:

BG<sub>12</sub> (filtru de excitație) + OG<sub>1</sub> (filtru de baraj), la care se adaugă filtru caloric.

Lame de microscop de 1 mm grosime din sticlă specială nefluorescentă.

Tampon-fosfat pH 7,1 — 7,2:

|                                              |              |
|----------------------------------------------|--------------|
| NaCl .....                                   | 8,5 g        |
| NaHPO <sub>4</sub> + 2H <sub>2</sub> O ..... | 1,28 g       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....        | 0,39 g       |
| apă distilată .....                          | la 1 000 ml. |

Glicerină tamponată: glicerină neutră 9 părți + tampon-fosfat 1 parte.

Ser fluorescent anti-gamaglobulină umană.

Institutul Cantacuzino livrează acest reactiv indicind diluția de lucru.

— Substratul antigenic. Se pot folosi celule; bacterii, antigene adsorbite pe hematii etc.

##### Metodă

— se decongelează un fragment de ficat de șobolan și se execută amprente, trei pe fiecare lamă. Nu se fixează. Ampretele se incercuiesc cu un creion dermatograf;



— substratul antigenic se acoperă cu serul cercetat (1—2 picături). În fiecare zi de lucru se folosește și un ser-martor negativ și un ser-martor pozitiv;

— preparatul se ține în cameră umedă, la temperatura laboratorului, 30 minute;

— se spală ușor cu soluție tampon de 2—3 ori;

— pe fiecare frotiu se pun 1—2 picături de ser fluorescent anti-gamaglobulină umană, diluat conform titrului;

— preparatele se țin din nou în cameră umedă la temperatura laboratorului, 30 minute;

— se spală ușor cu soluție tampon;

— montarea preparatului pe frontiu se pune o picătură de glicerină tamponată, apoi o lamelă.

### *Citirea rezultatelor*

Citirea se face într-o cameră întunecată la microscop, în lumină ultravioletă, cu obiectivul 40. Dacă testul e negativ (absența de ANF), se observă mici zone întunecoase care corespund nucleilor necolorați — pe un fond ușor verzui.

Dacă testul e pozitiv (prezența de ANF în serul bolnavului), pe fondul ușor verzui apar nucleii cu fluorescență strălucitoare de diverse aspecte:

— fluorescență omogenă (nucleul apare intens și uniform colorat); este produsă de factorii care reacționează cu nucleo-proteinele;

— fluorescență inelară (zona centrală nu e de loc sau slab colorată fluorescența maximă distribuită la periferia nucleului): corespunde factorilor anti-ADN. Se observă de regulă în formele grave de lupus eritematos disseminat (cu atingere renală);

— fluorescență pătată (distribuită în grămezi), produsă de factori care reacționează cu o fracțiune solubilă în tampon-fosfat. Apare în perioadele de remisiune ale bolii lupice;

— fluorescența nucleolară (localizată la nivelul nucleolilor): corespunde factorilor anti-ARN nucleolar.

## **METODE SEMICANTITATIVE**

### **METODA DE PRECIPITARE ÎN TUB (METODA UHLENHUT)**

Metoda se aplică pe un material reprezentat fie de diluția petei de singe, fie pe extractul produsului alimentar. Materialul trebuie să fie perfect limpede. Pentru efectuarea reacției se folosesc trei tuburi.

În tubul probă se pipetează:

— 0,9 ml din materialul de analizat

— 0,1 ml ser precipitant, cu o pipetă bine efilată la fundul tubului.

În tuburile martor se pipetează:

— ser precipitant și antigenul corespunzător pentru a controla eficacitatea serului precipitant (martor pozitiv);

— ser precipitant și soluție clorură de sodiu izotonică pentru a controla eventuala precipitare nespecifică (martor negativ).

Rezultatele se citesc după 15 minute, la temperatura laboratorului, intercalând între tuburi și sursa luminoasă un fond negru.

În caz de reacție pozitivă la limita de separație între materialul cercetat și serul precipitant apare un inel opalescent de precipitare. Pentru ca reacția să fie valabilă, tuburile martor negativ nu trebuie să prezinte acest inel.

#### METODE DE PRECIPITARE ÎN TUB CAPILAR (METODA Mc CARTY)

Această metodă se aplică pentru punerea în evidență a proteinei C reactive și a produșilor de degradare a fibrinogenului.

##### *Material și reactivi:*

1 — Tuburi capilare cu Ø 0,7 mm lungime 75—90 mm

2 — Ser uman de cercetat (antigen)

3 — Ser anti-proteină C reactivă (anticorp)

4 — Plastilină

*Modul de lucru:* tuburile sînt umplute prin capilaritate întii pînă la înălțimea de 25 mm, cu ser monospecific, apoi cu un volum egal de ser de cercetat nehemolizat.

După amestecarea acestora capilarul este fixat într-un bloc de plastilină, lăsat 2 ore la 37°C și în continuare la temperatura laboratorului pînă a doua zi. Apariția unui precipitat indică prezența proteinei „C” reactivă. Determinarea semicantitativă se apreciază în funcție de înălțimea zonei de precipitare:

1 mm +

2 mm ++

3 mm +++

#### METODE DE PRECIPITARE PE LAMĂ (METODA FERREIRA)

Această metodă se aplică pentru punerea în evidență a produșilor de degradare ai fibrinogenului care apar în serul bolnavilor cu sindrom de coagulare intravasculară diseminată.

##### *Material și reactivi*

1 — Tuburi de hemoliză Ø 1 cm/10 cm

2 — Lame de microscop 2,5/7,5 cm

3 — Ser de cercetat (antigen)

4 — Ser anti-fibrinogen (anticorp)

5 — Ser fiziologic (NaCl 8 g‰).

*Modul de lucru:* se fac diluții succesive din serul de cercetat pînă la 1/1024 în ser fiziologic, apoi se amestecă pe o lamă de microscop o picătură de ser imun monospecific antifibrinogen cu o picătură din fiecare diluție a serului uman. Reacția se urmărește 8—10 minute.

Apariția floculării indică prezența produșilor de degradare ai fibrinogenului din ser. Titrul acestor produși este dat de ultima diluție la care se mai observă flocularea.



DIFUZIA SIMPLĂ SAU IMUNODIFUZIA RADIALĂ SIMPLĂ (IDRS)

METODA MANCINI, CARBONARA, HEREMANS

Metoda este aplicată pentru determinarea cantitativă a fracțiunilor proteice greu sau imposibil de determinat prin metode fizicochimice.

*Material și reactivi:*

- 1 — Imunoplăci livrate de Institutul Cantacuzino sau de case producătoare de seruri anti-proteine plasmatice.
- 2 — Micropipete, microseringi simple sau automate
- 3 — Ser uman standard
- 4 — Seruri umane de cercetat

*Modul de lucru:* imunoplaca conține antiserul monospecific corespunzător, încorporat într-un strat de gel de agar 2%, în tampon veronal pH 8,6, f.i. 0,025.

Imunoplaca se scoate din ambalaj, se deschide fără precauțiuni de sterilitate și se îndepărtează cu atenție eventualul lichid (de condensare) de pe capac sau din godeuri și se numerotează godeurile.

În godeul central se introduce cu o micropipetă 0,005 ml (5  $\mu$ l) din serul uman de referință, apoi în godeurile periferice se introduc tot câte 5  $\mu$ l din serurile umane de cercetat. Pentru o mai mare precizie se recomandă probe duble. Imunoplaca cu godeurile încărcate se așază pe o suprafață perfect plană în termostat.

După o menținere de 24 ore la 37° pentru majoritatea proteinelor plasmatice și de 4 ore pentru IgG și albumină se citesc diametrele zonelor de precipitare, cu o riglă gradată transparentă. Diametrele sînt apoi transformate în unități internaționale sau mg% ml ser, folosind tabele care însoțesc produsul sau curbele etalon realizate cu cel puțin 3 diluții ale serului uman de referință (tabelul LXXVII și fig. 23).

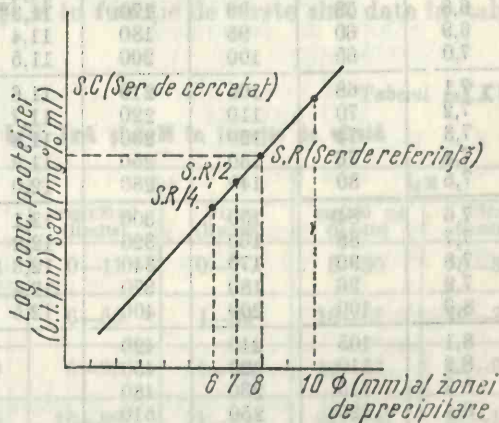
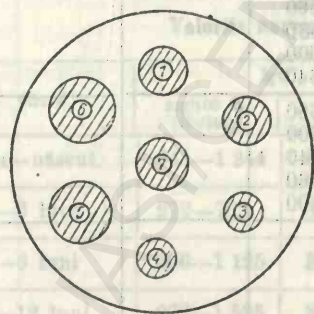


Fig. 23. — Imunodifuzia radială simplă (IDRS). Curba etalon realizată cu diluțiile serului uman de referință.

Valorile concentrațiilor Ig (U.I./ml) în funcție de diametrele (mm)  
obținute pe imunoplăci

| Diametrul<br>(mm) | IgA<br>albastru<br>24h, 37°C | IgG roșu<br>4h, 37°C | IgM galben<br>24h, 37°C | Diametrul<br>(mm) | IgA albastru<br>24h, 37°C | IgG roșu<br>4h, 37°C | IgM galben<br>24h, 37°C |
|-------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|----------------------|-------------------------|
| 4,0               | 5                            | 12                   | 25                      |                   |                           |                      |                         |
| 4,1               | 8                            | 13                   | 26                      | 8,6               | 135                       | 290                  | 600                     |
| 4,2               | 10                           | 14                   | 27                      | 8,7               | 138                       | 300                  | 640                     |
| 4,3               | 14                           | 15                   | 29                      | 8,8               | 145                       | 340                  | 680                     |
| 4,4               | 17                           | 16                   | 32                      | 8,9               | 150                       | 350                  | 700                     |
| 4,5               | 20                           | 17                   | 35                      | 9,0               | 160                       | 380                  | 800                     |
| 4,6               | 21                           | 19                   | 37                      | 9,1               | 165                       | 400                  | 840                     |
| 4,7               | 22                           | 20                   | 40                      | 9,2               | 175                       | 420                  | 900                     |
| 4,8               | 23                           | 21                   | 42                      | 9,3               | 180                       | 440                  | 960                     |
| 4,9               | 24                           | 23                   | 45                      | 9,4               | 190                       | 470                  | 1 000                   |
| 5,0               | 25                           | 24                   | 50                      | 9,5               | 200                       | 510                  | 1 100                   |
| 5,1               | 26                           | 26                   | 52                      | 9,6               | 210                       | 530                  |                         |
| 5,2               | 28                           | 28                   | 54                      | 9,7               | 220                       | 580                  |                         |
| 5,3               | 29                           | 30                   | 60                      | 9,8               | 230                       | 600                  |                         |
| 5,4               | 30                           | 33                   | 62                      | 9,9               | 240                       | 620                  |                         |
| 5,5               | 32                           | 35                   | 70                      | 10,0              | 250                       | 650                  |                         |
| 5,6               | 33                           | 37                   | 74                      | 10,1              | 260                       | 660                  |                         |
| 5,7               | 35                           | 40                   | 78                      | 10,2              | 270                       | 670                  |                         |
| 5,8               | 36                           | 43                   | 82                      | 10,3              | 290                       | 680                  |                         |
| 5,9               | 38                           | 48                   | 90                      | 10,4              | 300                       | 690                  |                         |
| 6,0               | 40                           | 50                   | 100                     | 10,5              | 310                       | 700                  |                         |
| 6,1               | 42                           | 52                   | 110                     | 10,6              | 330                       | 720                  |                         |
| 6,2               | 44                           | 56                   | 120                     | 10,7              | 340                       | 740                  |                         |
| 6,3               | 46                           | 60                   | 125                     | 10,8              | 360                       | 760                  |                         |
| 6,4               | 48                           | 66                   | 130                     | 10,9              | 380                       | 780                  |                         |
| 6,5               | 50                           | 70                   | 140                     | 11,0              | 400                       | 800                  |                         |
| 6,6               | 52                           | 78                   | 150                     | 11,1              | 520                       |                      |                         |
| 6,7               | 55                           | 80                   | 160                     | 11,2              | 440                       |                      |                         |
| 6,8               | 58                           | 90                   | 170                     | 11,3              | 460                       |                      |                         |
| 6,9               | 60                           | 95                   | 180                     | 11,4              | 480                       |                      |                         |
| 7,0               | 65                           | 100                  | 200                     | 11,5              | 500                       |                      |                         |
| 7,1               | 68                           | 105                  | 210                     | 11,6              | 530                       |                      |                         |
| 7,2               | 70                           | 110                  | 220                     | 11,7              | 560                       |                      |                         |
| 7,3               | 74                           | 120                  | 230                     | 11,8              | 580                       |                      |                         |
| 7,4               | 76                           | 130                  | 250                     | 11,9              | 600                       |                      |                         |
| 7,5               | 80                           | 140                  | 280                     | 12,0              | 640                       |                      |                         |
| 7,6               | 84                           | 150                  | 300                     | 12,1              | 660                       |                      |                         |
| 7,7               | 88                           | 160                  | 320                     | 12,2              | 700                       |                      |                         |
| 7,8               | 90                           | 170                  | 340                     | 12,3              | 740                       |                      |                         |
| 7,9               | 96                           | 180                  | 370                     | 12,4              | 760                       |                      |                         |
| 8,0               | 100                          | 200                  | 400                     | 12,5              | 800                       |                      |                         |
| 8,1               | 105                          | 210                  | 420                     |                   |                           |                      |                         |
| 8,2               | 110                          | 220                  | 450                     |                   |                           |                      |                         |
| 8,3               | 115                          | 230                  | 480                     |                   |                           |                      |                         |
| 8,4               | 120                          | 250                  | 510                     |                   |                           |                      |                         |
| 8,5               | 130                          | 280                  | 560                     |                   |                           |                      |                         |

Imunoplăci preparate cu seruri monospecifice anti Ig G, IgA, IgM (Institutul Cantacuzino)



Facultativ pentru a intensifica zonele de precipitare înainte de citirea diametrelor, imunoplăcile pot fi tratate cu o soluție de acid acetic 7% sau amestec (V/V) alcool-acid acetic 7%. Soluția de fixare se îndepărtează după un timp foarte scurt 20—30 secunde printr-o nouă spălare cu apă.

În cazul în care pentru serul uman de referință se obțin valori mai mari sau mai mici decât cele stabilite, provenite din cauza păstrării necorespunzătoare a imunoplăcilor erori de citire a diametrelor sau de pipetare se face corecția care constă în a scădea sau aduna diferența citită la valorile probelor de cercetat.

— Exemplu: dacă în cazul IgG serul standard are diametrul 7,5 mm în loc de 7 mm, se va scădea 0,5 mm pentru a obține diametrul de 7 = 100 U.I./ml. La fel se scad 0,5 mm din fiecare diametru al probei de cercetat de pe aceeași imunoplacă.

În general, se lucrează cu serul uman (ca atare) iar pentru mărirea preciziei în cazul determinărilor proteinelor serice cu concentrație mare (ex. IgG și albumină) se poate efectua o diluție de 1/10 sau 1/20, rezultatele citindu-se la 24 ore cînd are loc o difuzie completă.

Atenție!

Imunoplaca parțial folosită, dacă este perfect închisă și conservată la +4°C, poate fi refolosită și pentru alte determinări.

În vederea unei mai mari siguranțe se repetă și determinarea serului de referință.

Imunoplăci preparate cu seruri monospecifice anti IgG, IgA, IgM (Institutul Dr. I. Cantacuzino).

U.I. = Unități Internaționale:

100 U.I.IgG/ml = 800 mg/100 ml

100 U.I.IgA/ml = 140 mg/100 ml

100 U.I.IgM/ml = 80 mg/100 ml.

Correspondența între U.I./ml ser a IgG, A și M, se obține multiplicînd valoarea U.I. cu factorii:

— 8,00 pentru IgG

— 1,40 pentru IgA

— 0,80 pentru IgM

Valorile normale ale IgG, A și M în funcție de vîrstă sînt date în tabelul LXXVIII.

Tabelul LXXVIII

Valorile normale ale IgG, IgA și IgM în funcție de vîrstă

| vîrstă     | IgG                   |                  | IgA                   |                   | IgM                   |                   |
|------------|-----------------------|------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
|            | mg/100 ml<br>(limite) | UI/m<br>(limite) | mg/100 ml<br>(limite) | UI/ml<br>(limite) | mg/100 ml<br>(limite) | UI/ml<br>(limite) |
| nou-născut | 645—1 244             | 80—154           | 0—11                  | 0—7               | 5—30                  | 6—35              |
| 1—3 luni   | 272—762               | 33—94            | 6—56                  | 4—39              | 16—67                 | 19—79             |
| 4—6 luni   | 206—1 125             | 25—139           | 8—93                  | 5—65              | 10—83                 | 11—98             |
| 7—12 luni  | 279—1 533             | 34—190           | 16—98                 | 11—69             | 22—147                | 27—175            |
| 13—24 luni | 258—1 393             | 32—173           | 19—119                | 13—83             | 14—114                | 16—135            |

| vîrsta     | IgG                   |                   | IgA                   |                   | IgM                   |                   |
|------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|
|            | mg/100 ml<br>(limite) | UI/ml<br>(limite) | mg/100 ml<br>(limite) | UI/ml<br>(limite) | mg/100 ml<br>(limite) | UI/ml<br>(limite) |
| 25—36 luni | 419—1 274             | 52—158            | 19—235                | 13—165            | 28—113                | 33—135            |
| 3—5 ani    | 569—1 597             | 70—198            | 55—152                | 38—107            | 22—100                | 26—119            |
| 6—8 ani    | 599—1 492             | 74—185            | 54—221                | 38—155            | 27—118                | 32—140            |
| 9—11 ani   | 799—1 456             | 99—181            | 62—208                | 42—146            | 35—132                | 41—157            |
| 12—16 ani  | 726—1 035             | 90—128            | 70—229                | 49—161            | 35—72                 | 41—85             |
| Adulți     | 800—1 600             | 100—200           | 100—350               | 70—280            | 80—160                | 100—200           |

## ELECTROIMUNODIFUZIA (EID) (METODA LAURELL)

**Principiul:** Precipitatul dat de complexul antigen-anticorp duce la formarea unui con (rachetă) a cărei lungime (înălțime) este proporțională cu cantitatea de antigen din probele de cercetat. Metoda prezintă avantajul că se pot măsura foarte exact cantități mici de proteine conținute în lichide diluate fără a necesita concentrarea anterioară a lor.

**Reactivi:**

- 1 — Tampon veronal pH = 8,6, f.i. 0,025.
- Laurrell recomandă pentru o separare mai bună adăugarea de 0,4 g lactat de calciu la 1 000 ml tampon veronal pH = 8,6;
- 2 — Agar special Noble Difco 1% g/ml; tampon veronal pH = 8,6;
- 3 — Soluție de agar 0,1%, folosită la impregnarea lamelor;
- 4 — Ser antimonospecific (cu o concentrație cunoscută în anticorpi);
- 5 — Probele de cercetat (ser, LCR, diverse concentrații de ser de referință folosite pentru alcătuirea curbei de calibrare);
- 6 — Soluție de colorare:
  - amidoschwartz 10 B..... 1 g%
- 7 — Soluție de decolorare:
  - etanol ..... 450 ml
  - acid acetic glacial ..... 100 ml
  - H<sub>2</sub>O distilată ..... 450 ml.
- 8 — Soluție de fixare:
  - acid picric ..... 800 ml soluție saturată (1,4%)
  - acid acetic glacial ..... 200 ml.
- 9 — Soluțiile de spălare sint:
  - NaCl (0,1 M) și apă distilată

**Material:**

- 1 — Aparat de electroforeză
- 2 — Lame de sticlă 6/9
- 3 — Pipete și micropipetă de 5 microlitri
- 4 — Hîrtie Wattman Nr. 1 sau Nr. 4 pentru punți
- 5 — Ștanțe pentru tăierea godeurilor
- 6 — Riglă pentru măsurat.



### Metodă:

Pe lamă de sticlă (6/8 cm) bine spălată și degresată se toarnă 6 ml amestec de antiser cu agar sau agaroză 0,8%. Amestecul se pregătește pe baie de apă la 50—56°C, folosind cantitățile prestabilite de antiser.

După solidificarea gelului, pe latura de 8 cm a lamei se practică 10 godeuri cu un diametru de 3 mm la distanță de 3 mm, cu godeurile extreme la 1 cm de marginea lamei. Lamele se așază în aparatul de electroforeză cu godeurile dispuse spre polul pozitiv sau spre cel negativ, în funcție de sensul migrării antigenului a cărei concentrație trebuie determinată.

În fiecare godeu se introduce un volum de 3 microlitri din proba de cercetat ca atare sau diluată. Lamele astfel pregătite sînt supuse migrării electroforetice, realizîndu-se un amperaj de 2 mA/cm lamă sau 350 V, timp de 6—7 ore. Timpul de migrare depinde de cantitatea de antigen folosită în relație cu concentrația de anticorp înglobată.

După migrare, lamele pot fi lăsate în aparatul de electroforeză peste noapte, fără ca zonele de precipitare să se altereze.

### Citirea lamelor:

Lamele pot fi citite imediat ca atare la o sursă de lumină sau pot fi spălate, uscate și colorate.

Complexul antigen—anticorp formează o zonă de precipitare de forma unui con, a cărei lungime este proporțională cu cantitatea de antigen din probă.

Măsurarea înălțimii conului se face cu o hirtie milimetrică sau cu o riglă, din virful și pînă la baza conului. Concentrația proteinelor din probe se citește pe o curbă standard realizată cu diferite diluții de ser de referință IC.

**Curba de calibrare:** se construiește pe o hirtie semilogaritmică, așezînd pe abscisă concentrația probei de antigen, iar pe ordonată înălțimea conului în mm. Relația între concentrația de antigen din diluțiile serului de referință și înălțimea precipitatului va fi de cele mai multe ori lineară.

Concentrația proteinelor în soluția de referință se va exprima în mg% ml ser sau în UI/ml. Probele de cercetat pot fi diluate sau concentrate obținîndu-se concentrații comparabile cu cele din soluția de referință.

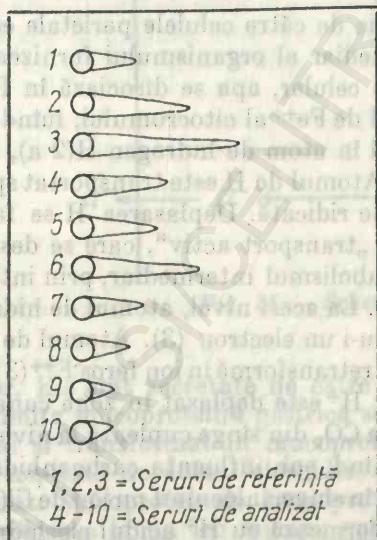
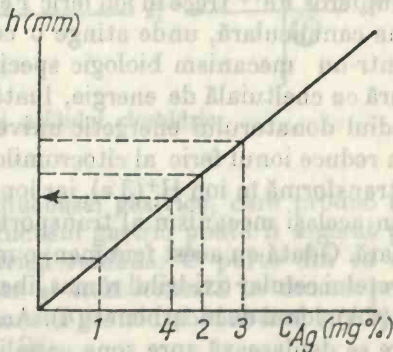


Fig. 24. — Electroimunodifuzia (EID).



## CAPITOLUL V

### EXPLORAREA TUBULUI DIGESTIV

Cavitatea bucală, stomac, duoden,  
intestin subțire și colon

#### STOMACUL

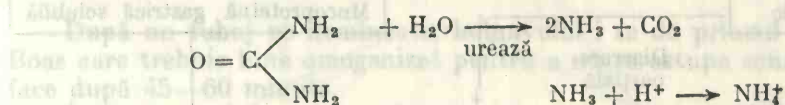
Explorarea funcțională a stomacului are la bază examenul sucului gastric.

Sucul gastric provine din secreția unui mare și variat număr de celule ale mucoasei gastrice. Reacția acidă pe care o posedă se datorește acidului clorhidric secretat de celulele epitelului parietal. Celulele mucoasei gastrice și celulele peptice secretă în special bicarbonați și cloruri care tamponează aciditatea dată de acidul clorhidric.

Mecanismul producerii acidului clorhidric de către celulele parietale este prezentat în figura 25. Metabolismul intermediar al organismului furnizează energie,  $\text{CO}_2$  și  $\text{H}_2\text{O}$ . În apropierea peretelui celular, apa se disociază în  $\text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$  (1), iar ionul de hidrogen oxidează ionul de  $\text{Fe}^{++}$  al citocromului, luându-i un electron (2). Ca urmare  $\text{H}^+$  se transformă în atom de hidrogen  $\text{H}$  (2 a), iar ionul feros  $\text{Fe}^{++}$  trece în ion feric  $\text{Fe}^{+++}$  (2 b). Atomul de  $\text{H}$  este transportat spre zona canaliculară, unde atinge o concentrație ridicată. Deplasarea  $\text{H}$  se face printr-un mecanism biologic special, numit „transport activ“, care se desfășoară cu cheltuială de energie, luată din metabolismul intermediar, prin intermediul donatorului energetic universal ATP. La acest nivel, atomul de hidrogen reduce ionul feric al citocromilor, cedându-i un electron (3). Atomul de  $\text{H}$  se transformă în ion  $\text{H}^+$  (3 a), iar ionul feric se retransformă în ion feros  $\text{Fe}^{++}$  (3 b). Prin același mecanism al transportului activ  $\text{H}^+$  este deplasat în zona canaliculară. Odată cu acest fenomen, o moleculă de  $\text{CO}_2$  din sânge cuplează la nivelul peretelui celular oxidrilul rămas liber (1), formând, sub influența carboanhidrazei (CA), ionul de bicarbonat (4). Acesta trece în sânge, înlocuind un ion de  $\text{Cl}$  (5), care se deplasează spre zona canaliculară și formează cu  $\text{H}^+$  acidul clorhidric.



Cînd ionii de  $H^+$  și  $Cl^-$  pătrund în concentrații prea ridicate, în celulele neparietale intră în joc un mecanism protector — urează — care la acest nivel se află în cantități mari și descompune ureea în  $NH_3$  și  $CO_2$ ; amoniacul formează apoi cu  $H^+$ , ionul  $NH_4^+$  care este eliminat:



Este de remarcat că celulele mucoasei gastrice care nu sînt adaptate acidității pronunțate din zona celulelor parietale ar fi coagulate sau digerate de către pepsină, a cărei activitate în stomac este foarte intensă. Acest lucru nu se întîmplă, deoarece mucinele sucului gastric joacă un al doilea rol protec-

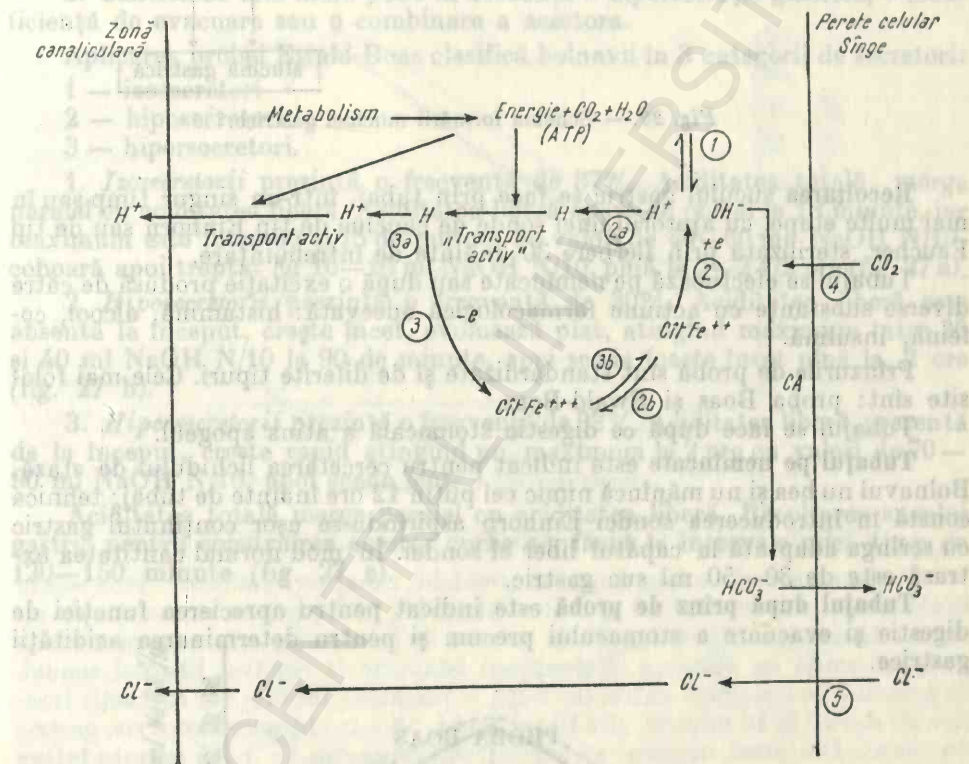


Fig. 25. — Schema secreției acidului clorhidric.

tor. Ele sînt secretate de către celulele mucoasei gastrice, care produc așa-numita mucoproteină gastrică solubilă. Mucusul gastric poate fi digerat parțial și transformat în mucoprotează gastrică solubilă. O parte din ea este precipitată de acidul clorhidric din stomac și transformată în mucus precipitat. Mucoproteinele, mucoproteaza, mucusul gastric și mucusul precipitat alcătuiesc la un loc mucina gastrică (fig. 26).

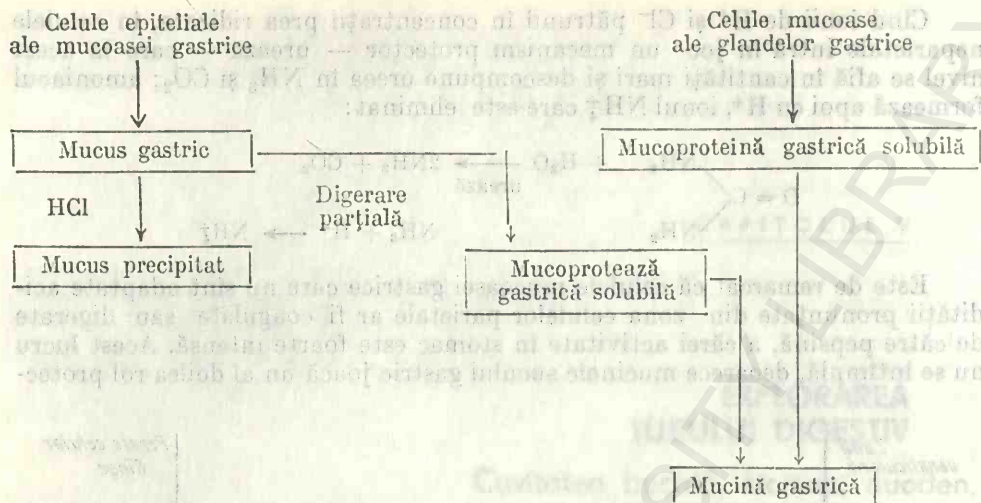


Fig. 26. — Schema formării mucinei gastrice.

Recoltarea sucului gastric se face prin tubaj, într-un singur timp sau în mai multe etape, cu ajutorul unei sonde de cauciuc de tip Einhorn sau de tip Faucher, sterilizată prin fierbere 30' înainte de întrebuințare.

Tubajul se efectuează pe nemîncate sau după o excitație produsă de către diverse substanțe cu acțiune farmacologică adecvată: histamină, alcool, cofeină, insulină.

Prînzurile de probă sînt standardizate și de diferite tipuri. Cele mai folosite sînt: proba Boas și Ewald-Boas.

Tubajul se face după ce digestia stomacală a atins apogeul.

Tubajul pe nemîncate este indicat pentru cercetarea lichidului de stază. Bolnavul nu bea și nu mănîncă nimic cel puțin 12 ore înainte de tubaj; tehnica constă în introducerea sondei Einhorn aspirîndu-se ușor conținutul gastric cu siringa adaptată la capătul liber al sondei. În mod normal cantitatea extrasă este de 30—50 ml suc gastric.

Tubajul după prînz de probă este indicat pentru aprecierea funcției de digestie și evacuare a stomacului precum și pentru determinarea acidității gastrice.

#### PROBA BOAS

Se administrează bolnavului la ora 20 cîna de probă tip Boas, care conține:

- piine albă prăjită cu unt .. 50—70 g
- carne rece ..... 50 g
- ceai cu puțin zahăr ..... 200 ml

Bolnavul nu mai îngerează nimic și a doua zi la ora 8 se face tubajul.

#### Rezultate

1 — cantitatea extrasă în mod normal nu depășește 100 ml; o cantitate mai mare demonstrează o hipersecreție gastrică;



2 — resturile alimentare în mod normal lipsesc; prezența resturilor alimentare demonstrează insuficiența evacuatoare.

#### PROBA EWALD-BOAS

După un tubaj pe nemîncate, bolnavului i se dă prinzul de tip Ewald-Boas care trebuie bine omogenizat pentru a nu se astupa sonda. Tubajul se face după 45—60 minute.

Prinzul conține:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| — pline (chiflă) ..... | 50—70 g |
| — ceai cu zahăr .....  | 300 ml  |

#### Rezultate

1. Cantitatea extrasă în mod normal nu depășește 100 ml.
2. Cantitatea mai mare pune în evidență o hipersecreție gastrică, o insuficiență de evacuare sau o combinație a acestora.

Aplicarea probei Ewald-Boas clasifică bolnavii în 3 categorii de secretori:

- 1 — izosecretori
- 2 — hiposecretori
- 3 — hipersecretori.

1. *Izosecretorii* prezintă o frecvență de 37%. Aciditatea totală merge paralel cu aciditatea liberă. Aciditatea liberă apare de obicei la 18 minute, iar maximum este între 60 și 75 de minute, cu valori de 40—60 ml NaOH N/10, coboară apoi treptat cu 10—15 ml NaOH N/10, pînă la 2—2 1/2 ore (fig. 27 a).

2. *Hiposecretorii* prezintă o frecvență de 30%. Aciditatea liberă este absentă la început, crește încet, evoluează plat, atingînd maximum între 30 și 40 ml NaOH N/10 la 90 de minute, apoi scade foarte încet pînă la 2 ore (fig. 27 b).

3. *Hipersecretorii* prezintă o frecvență de 33%. Aciditatea liberă, prezentă de la început, crește rapid atingînd un maximum la 2 ore cu valori de 70—90 ml NaOH N/10, apoi scade lent.

Aciditatea totală merge paralel cu aciditatea liberă. Recoltarea sucului gastric pentru construirea acestor curbe s-a făcut la intervale mici, timp de 120—150 minute (fig. 27 c).

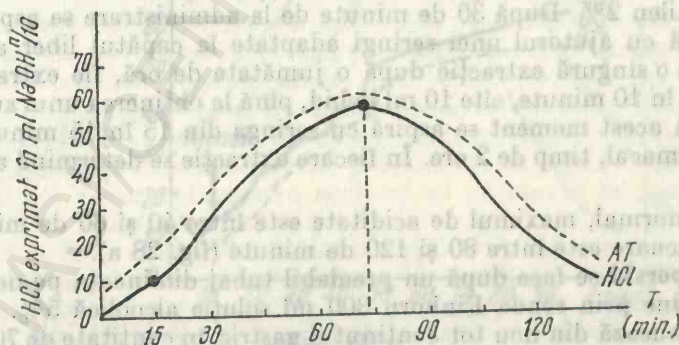


Fig. 27. —

a) Curba activității izosecretoare;

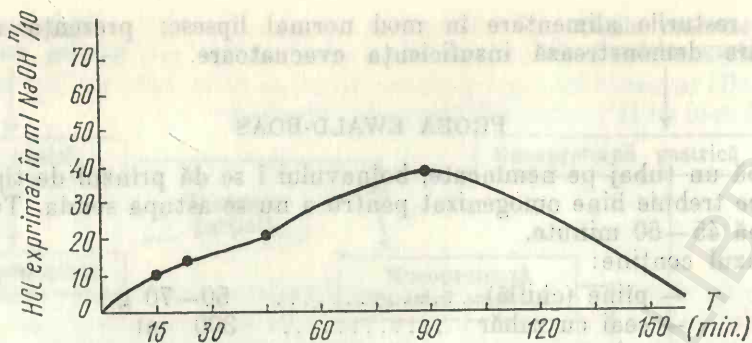


Fig. 27 b

b) Curba activității hiposecretoare;

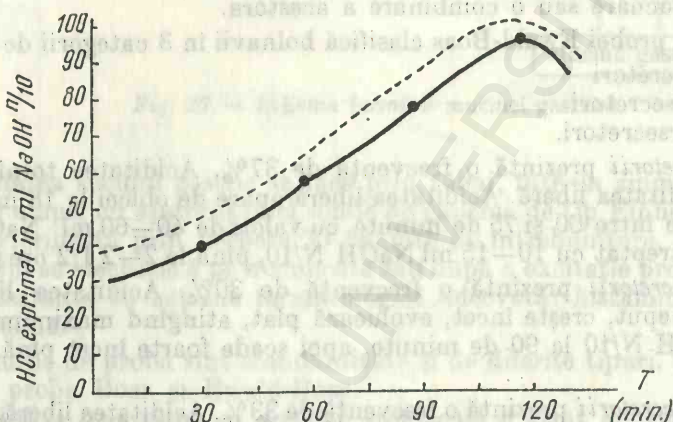


Fig. 27 c

c) Curba activității hipersecretoare.

### STIMULAREA SUCULUI GASTRIC CU ALCOOL ȘI HISTAMINĂ

**Proba cu alcool** se face după un prealabil tubaj pe nemincate. Prin sonda Einhorn se introduc 300 ml apă alcoolizată 5% și 3 picături de soluție de albastru de metilen 2%. După 30 de minute de la administrare se aspiră secreția prin sondă cu ajutorul unei seringi adaptate la capătul liber al sondei. Se practică fie o singură extracție după o jumătate de oră, fie extracții fracționate din 10 în 10 minute, câte 10 ml lichid, pînă la obținerea unui suc gastric decolorat. Din acest moment se aspiră cu siringa din 15 în 15 minute întreg conținutul stomacal, timp de 2 ore. În fiecare extracție se determină aciditatea totală.

În cazul normal, maximul de aciditate este între 40 și 60 de minute, iar timpul de evacuare este între 80 și 120 de minute (fig. 28 a).

**Proba Leporski** se face după un prealabil tubaj dimineața pe nemincate, apoi se introduce prin sonda Einhorn 300 ml soluție alcoolică 5%. După 25 minute se evacuează din nou tot conținutul gastric, în cantitate de 70–80 ml. În continuare se fac 4 extracții totale la intervale de cite 15 minute. Suma cantităților obținute constituie efortul secretor pe oră, care în stare normală



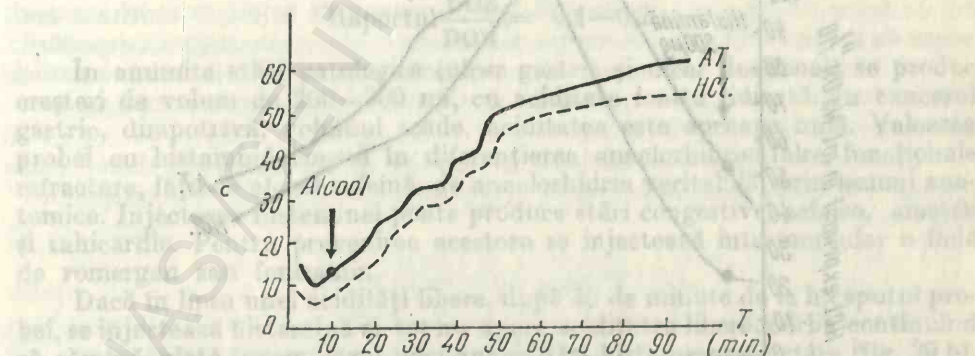
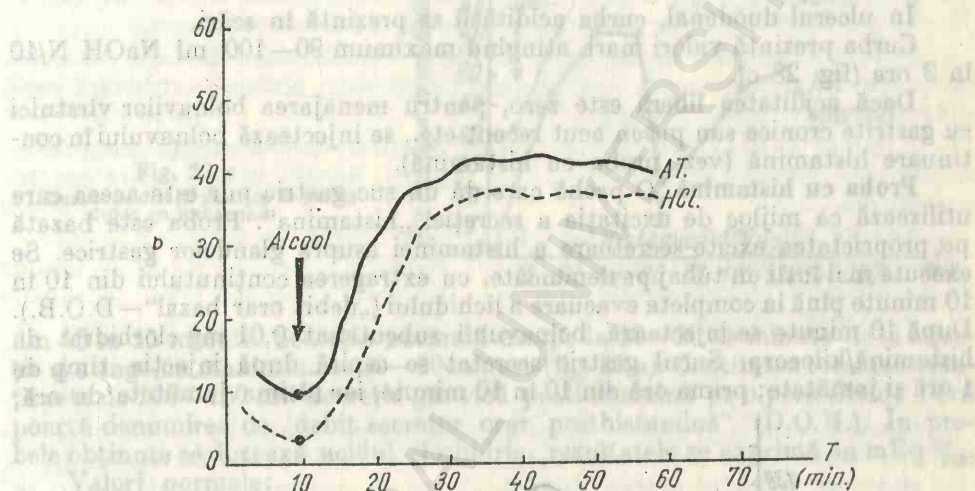
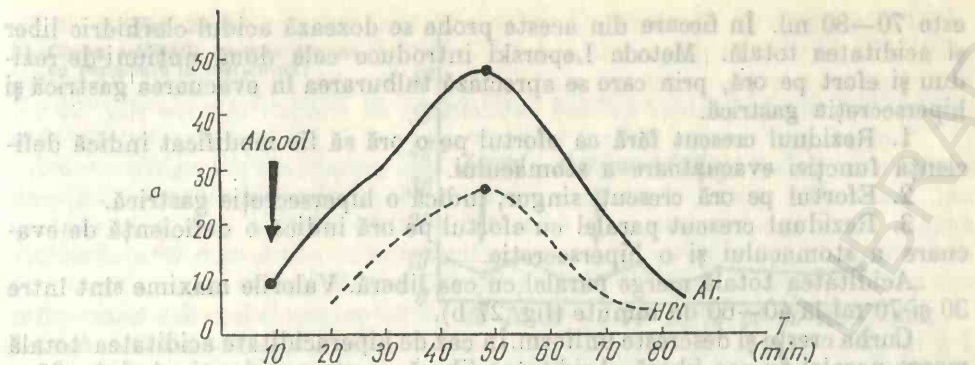


Fig. 28. —

a) Curba acidității gastrice după proba cu alcool (normal); b) Curba acidității gastrice după proba cu alcool (curbă în platou); c) Curba acidității în ulcerul duodenal (în „scară”).

este 70—80 ml. În fiecare din aceste probe se dozează acidul clorhidric liber și aciditatea totală. Metoda Leporski introduce cele două noțiuni de reziduu și efort pe oră, prin care se apreciază tulburarea în evacuarea gastrică și hipersecreția gastrică.

1. Reziduu crescut fără ca efortul pe o oră să fie modificat indică deficiența funcției evacuatoare a stomacului.

2. Efortul pe oră crescut, singur, indică o hipersecreție gastrică.

3. Reziduu crescut paralel cu efortul pe oră indică o deficiență de evacuare a stomacului și o hipersecreție.

Aciditatea totală merge paralel cu cea liberă. Valorile maxime sînt între 30 și 70 ml la 40—60 de minute (fig. 27 b).

Curba crește și descrește uniform. În caz de hiperaciditate aciditatea totală merge paralel cu cea liberă. Aciditatea liberă crește rapid, atîngînd la 30—40 minute valori de 40—80 ml NaOH N/10, iar aciditatea totală 70—100 ml NaOH N/10.

În ulcerul duodenal, curba acidității se prezintă în scări.

Curba prezintă valori mari, atîngînd maximum 90—100 ml NaOH N/10 în 3 ore (fig. 28 c).

Dacă aciditatea liberă este zero, pentru menajarea bolnavilor vîrstnici cu gastrite cronice sau puseu acut recent etc., se injectează bolnavului în continuare histamină (vezi proba cu histamină).

**Proba cu histamină.** O probă care dă un suc gastric pur este aceea care utilizează ca mijloc de excitație a secreției „histamina”. Proba este bazată pe proprietatea excito-secretoare a histaminei asupra glandelor gastrice. Se execută mai întîi un tubaj pe nemîncate, cu extragerea conținutului din 10 în 10 minute pînă la completa evacuare a lichidului („debit orar bazal”—D.O.B.). După 10 minute se injectează bolnavului subcutanat 0,01 mg clorhidrat de histamină/kilocorp. Sucul gastric secretat se aspiră după injecție timp de 1 oră și jumătate; prima oră din 10 în 10 minute, iar ultima jumătate de oră,

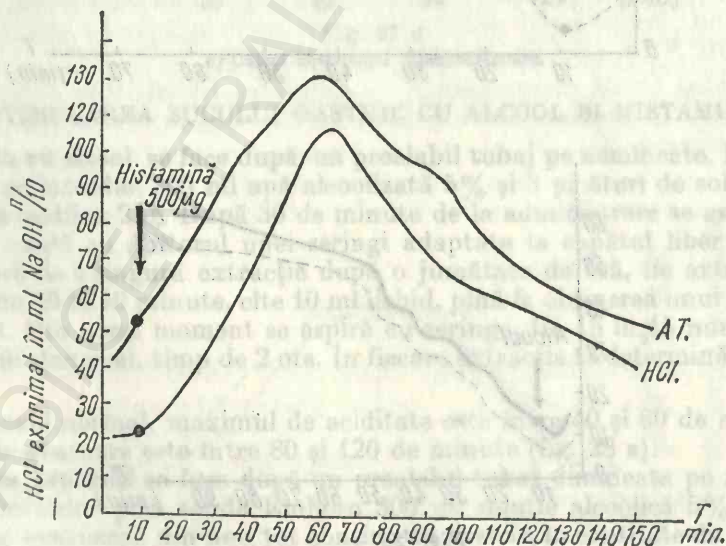


Fig. 29 a

a) Curba secreției de acid clorhidric după histamină;



Fig. 29 b

b) Curba acidității gastrice în caz de rezistență la histamină;

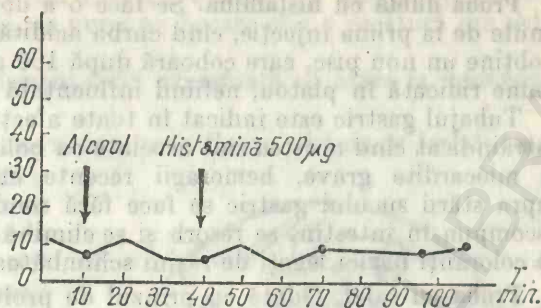
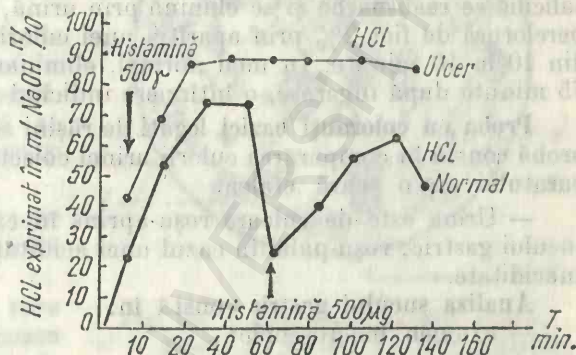


Fig. 29 c

c) Curba acidității gastrice în proba dublă cu histamină.



din 15 în 15 minute. Secreția normală începe la 10—20 de minute de la injecție și atinge un maximum la 30—60 minute (fig. 29 a). Cantitatea totală secretată este de 100—150 ml. Secreția gastrică posthistamină pe o perioadă de 1 oră poartă denumirea de „debit secretor orar posthistamină” (D.O.H.). În probele obținute se dozează acidul clorhidric, rezultatele se exprimă în mEq %<sub>100</sub>.

Valori normale:

20—30 mEq %<sub>100</sub> în proba DOB

40—50 mEq %<sub>100</sub> în proba DOH

Raportul  $\frac{DOB}{DOH} = 0,1-0,2$ .

În anumite stări patologice (ulcer gastric și ulcer duodenal) se produc creșteri de volum de 200—300 ml, cu aciditate foarte ridicată. În cancerul gastric, dimpotrivă, volumul scade, aciditatea este aproape nulă. Valoarea probei cu histamină constă în diferențierea anaclorhidriei false, funcționale refractare, față de alcool-cofeină, de anaclorhidria veritabilă, prin leziuni anatomiche. Injectarea histaminei poate produce stări congestive, cefalee, amețeli și tahicardie. Pentru prevenirea acestora se injectează intramuscular o fiolă de romergan sau feniramin.

Dacă în lipsa unei acidități libere, după 40 de minute de la începutul probei, se injectează histamină și tot nu apare aciditatea liberă, curba continuând să rămână plată, avem cazul unei anacidități histaminorefractare (fig. 29 b).

Dacă după 40 de minute de la începutul probei apare aciditatea liberă și valorile cresc, iar curba ia forma de clopot, aceasta denotă că mucoasa rămasă mai este capabilă să secrete și avem cazul unei anacidități histaminopozitive.

**Proba dublă cu histamină.** Se face o a doua injecție cu histamină la 80 minute de la prima injecție, când curba acidității începe să scadă. La normali se obține un nou pisc, care coboară după 160 minute. În hipersecreție curba rămâne ridicată în platou, nefiind influențată de a doua injecție (fig. 29 c).

Tubajul gastric este indicat în toate afecțiunile tubului digestiv dar este contraindicat când acestea sînt asociate cu boli pulmonare grave, hipertensiune, miocardite grave, hemoragii recente etc. În aceste cazuri orientarea asupra stării sucului gastric se face fără sondaj, folosind substanțe care se descompun în intestin, se resorb și se elimină prin urină, cum este „Salolul” sau coloranți bazei legați de rășini schimbătoare de ioni.

**Proba cu salol.** Odată cu prînzul de probă se administrează bolnavului 1 g de salol, care se descompune în intestin, în fenol și acid salicilic. Acidul salicilic se reabsoarbe și se elimină prin urină, unde este pus în evidență cu perclorură de fier 2% prin apariția unei culori violet. Se examinează urina din 10 în 10 minute. În mod normal, eliminarea acidului salicilic începe la 75 minute după ingerare, o întârziere indicînd o jenă evacuatoare.

**Proba cu coloranți bazei legați de rășini schimbătoare de ioni.** Această probă constă în compararea culorii urinei colectate în urma administrării preparatului cu o scară etalon.

— Urina este de culoare roșu-aprins în cazul unei acidități normale a sucului gastric; roșu-palid în cazul unei acidități scăzute și slab-roz în caz de anaciditate.

**Analiza sucului gastric constă în:**

- examen macroscopic;
- examen microscopic;
- examen chimic.

#### EXAMENUL MACROSCOPIC

Cantitatea de suc gastric extrasă după prînzul de probă se măsoară cu cilindrul gradat. Are limite bine definite în funcție de proba de recoltare.

**Aspectul.** Lichidul extras, după 1—2 ore de menținere într-un pahar, se separă în 2 straturi, unul inferior, format din resturi de pîine; și altul superior, compus din ceaiul ingerat și sucul gastric secretat. În condițiile normale, stratul de depozit solid este aproximativ egal cu stratul de lichid. O cantitate mai mare de lichid arată o hipersecreție, iar în caz contrar o încetinire a evacuării.

**Mirosul** este fad sau ușor acid, mai alës în hiperaciditate. Acizii organici (lactic, butiric, acetic) îi imprimă un miros acru-rîncez, iar în cazuri de neoplasm gastric are un miros aparte.

**Culoarea** este gălbuie-albicioasă în condiții normale, verde-galbenă când conține bilă, roșie pînă la brună în prezența sîngelui (după vechime și cantitatea acestuia).

#### EXAMENUL MICROSCOPIC (fig. 30)

Reactivi: Sudan III soluție 0,1% în alcool 60°

Lugol: 0,5 g iod + 1 g iodură de potasiu în 100 ml apă distilată.

Examenul microscopic al sucului gastric se face pe sedimentul obținut prin centrifugarea sau sedimentarea spontană a lichidului recoltat prin tubaj. În acest scop se folosesc preparate proaspete între lamă și lamelă ca atare



sau tratate cu soluție Sudan III sau Lugol. Pe lame de microscop perfect curate și numerotate de la 1 la 4, se pune pe fiecare câte o picătură din sediment.

*Lama nr. 1:* picătura de sediment fiind examinată ca atare la microscop se acoperă cu o lamelă.

În sucurile gastrice alcaline sau neutre se întâlnesc cristale de fosfați amoniaco-magnezieni. Cristalele de tirozină și leucină apar în cazuri de stază. Prezența fibrelor musculare indică o încetinire a evacuării și sint foarte vizibile în caz de hiposecreție gastrică. În sucurile patologice pot fi întâlnite și eritrocite.

*Lama nr. 2:* picătură se întinde pe lamă, se usucă și se colorează ca un frotiu de sînge (May-Grünwald-Giemsa). Apoi se examinează cu imersie pentru elemente celulare și microorganisme.

În sucurile gastrice acide se găsesc enterococi, coci, bacili Boas-Oppler.

În mod normal se găsesc rare epiteliu plate, provenite din mucoasa stomacală, rare leucocite normale sau parțial digerate, mucus, rare microorganisme și ciuperci.

În hiperaciditate se observă resturi nucleare. În gastritele cronice există o abundență de celule plate. În cancerul gastric se găsesc uneori celule atipice izolate sau în grupuri. Ele se disting prin unul sau mai mulți nuclei de volum considerabil.

În anaclohidrii leucocitele nu sint distruse.

*Lama nr. 3:* se amestecă picătura de pe lamă cu o picătură de Sudan III pentru a se examina la microscop și apoi se acoperă cu o lamelă.

Grăsimile sint colorate portocaliu, prezența lor în cantitate mare după un prînz de probă indică o încetinire a evacuării.

*Lama nr. 4:* picătura de pe lamă în acest caz se amestecă cu o picătură de Lugol, se acoperă cu o lamelă, se examinează la microscop. Granulele de amidon sint colorate în albastru, ele nu prezintă valoare de diagnostic.

Număratoarea leucocitelor din suc gastric se face în camera Bürcker ca la sînge.

*Modul de lucru:* 1 ml sediment se amestecă cu 9 ml ser fiziologic. Din diluția obținută la 2 ml se adaugă 2—3 picături de albastru de metilen 1%. În mod normal numărul leucocitelor este de 80—350/mm<sup>3</sup>. Valori de circa 2500—6500 se găsesc în gastritele cronice și cancer.

În sucurile gastrice alcaline sau neutre pot fi de asemenea întîlnite diverse cristale de fosfați amoniaco-magnezieni și magnezieni precum și cristale de colesterină. Cristale de tirozină și leucină apar în cazuri de stază gastrică.

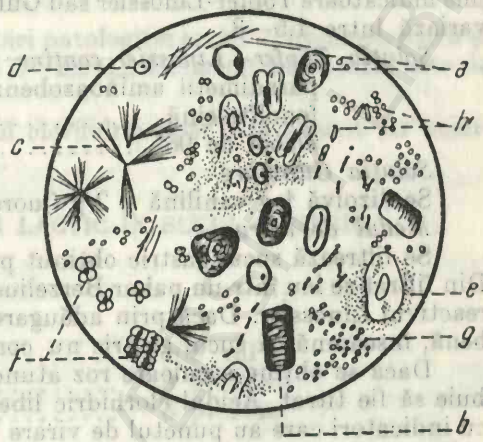


Fig. 30. — Sedimentul sucului gastric.

a = grăunțe de amidon; b = fibre musculare;  
c = cristale de acizi grași; d = picături de grăsime;  
e = celule epiteliale plate; f = sarcine; g = ciuperci;  
h = bacili Boas-Oppler.

## EXAMENUL CHIMIC

Sucul gastric conține acid clorhidric liber și acid clorhidric combinat cu proteine. Noaptea, aciditatea este redusă; ea crește peste zi atîngînd un maximum către seară.

Determinarea pH-ului sucului gastric se poate efectua rapid cu hîrtie indicatoare sau prin metode colorimetrice. În cazul din urmă se folosesc soluțiile indicatoare Töpfer-Linossier sau Günsburg. pH-ul normal al sucului gastric variază între 1,5—3.

*Soluția Töpfer—Linossier conține:*

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| paradimetil aminoazobenzol | 0,25 g |
| fenoltaleină               | 1 g    |
| alcool de 96°              | 100 ml |

*Soluția Günsburg*

Se dizolvă 1 g vanilină și 2 g fluoroglucină în 30 ml alcool de 90°.

*Modul de lucru*

Se filtrează sucul gastric obținut prin tubaj în urma prînzului de probă. Din filtrat se iau într-un pahar Berzelius cîtiva ml. Se adaugă o picătură din reactivul Linossier. Dacă prin adăugarea reactivului se obține o culoare galbenă, înseamnă că sucul gastric nu conține acid clorhidric liber.

Dacă se obține o culoare roz atunci există acid clorhidric liber care trebuie să fie titrat. Acidul clorhidric liber din sucul gastric se poate identifica cu indicatori care au punctul de virare la pH = 3—4. Dintre aceștia se poate utiliza roșu de Congo, cu punctul de virare la pH = 3 și para-dimetil-aminoazobenzolul cu punctul de virare la pH = 2,9.

## DOZAREA ACIDITĂȚII

Pentru dozarea acidității se folosește metoda volumetrică. Această metodă constă în titrarea cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu N/10 mai întîi a acidului clorhidric liber în prezența reactivului Linossier care virează la pH-ul de 3,5 și apoi a acidului clorhidric combinat în prezența fenoltaleinei ca indicator care virează la pH-ul de 8,2.

*Reactivi*

1. Soluție de hidroxid de sodiu 0,1 N

2. Reactivul Linossier sau Günsburg

*Modul de lucru:* la 10 ml suc gastric obținut prin tubaj (care în prealabil a fost filtrat) se adaugă 5 ml apă și 2—3 picături din reactivul Linossier. Dacă prin adăugarea reactivului se obține o culoare galbenă nu se trece la titrare. În cazul că se obține o culoare roz proba se titrează cu o soluție de NaOH 0,1 N pînă la apariția culorii galbene-portocaliu.

Se notează cu „n<sub>1</sub>” numărul de ml de NaOH 0,1 N întrebunțați. Apoi se continuă titrarea mai departe cu aceeași soluție de NaOH 0,1 N pînă la apariția unei culori roz. Se notează cu „n<sub>2</sub>” numărul de ml de NaOH 0,1 N întrebunțați pentru a doua titrare.

*Calcul*

1 ml dintr-o soluție de HCl 0,1 N corespunde la 1 ml dintr-o soluție de NaOH 0,1 N. 1 ml din soluția de acid clorhidric 0,1 N conține 0,00365 g HCl‰.

g‰ acid clorhidric liber =  $n_1 \times 0,00365 \times 100$

g‰ acid clorhidric combinat =  $n_2 \times 0,00365 \times 100$

Aciditatea totală =  $(n_1 + n_2) \times 0,00365 \times 100$ .



### Valori normale

În sucul gastric recoltat pe nemincate, aciditatea totală este de 2‰, iar aciditatea clorhidrică liberă este de 0,7‰.

După prinzul cu alcool aciditatea este egală cu 1,8–2 g‰, iar cea liberă cu 0,5–0,8 g‰.

După proba cu histamină aciditatea totală este egală cu 2–3 g‰, iar cea liberă cu 1,7 g‰.

Aceste valori sînt modificate în stări patologice; astfel în hiperclorhidrii și ulcere acidul clorhidric liber este de 1,6–2,9‰, iar aciditatea totală este de 3–5 g‰.

În cancere și anemii grave acidul clorhidric liber este absent iar aciditatea totală este de 0,20–0,50 g‰.

## DETERMINAREA ACIDULUI LACTIC ÎN SUCUL GASTRIC

### Reacția Berg

#### Reactivul Berg:

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| H <sub>2</sub> O distilată | 100 ml     |
| clorură ferică 30%         | 3 picături |
| HCl concentrat             | 3 picături |

*Modul de lucru:* în trei eprubete se pipetează:

|               | probă  | martor I | martor II |
|---------------|--------|----------|-----------|
| apă distilată | 4,5 ml | 5,0 ml   | 5,0 ml    |
| reactiv Berg  | 0,5 ml | 0,5 ml   | —         |
| suc gastric   | 0,5 ml | —        | 0,5 ml    |

Prezența acidului lactic intensifică culoarea reactivului Berg trecînd în verde-galben.

O culoare roșie-portocalie poate fi dată de prezența sulfocianatului din saliva înghițită.

### Reacția Uffelman

Reactivul: clorură ferică 20%.

soluția apoasă de fenol 1%

La 1 ml soluție fenolică 1% se adaugă 2–3 picături de clorură ferică 20%. Se diluează cu apă pînă la culoarea violet ametist.

*Modul de lucru.* În trei eprubete se pipetează:

|                  | proba | martor I | martor II |
|------------------|-------|----------|-----------|
| suc gastric      | 2 ml  | —        | 5 ml      |
| reactiv Uffelman | 2 ml  | 2 ml     | —         |
| ser fiziologic   | —     | 5 ml     | 2 ml      |

Culoarea albastră-violet a reactivului se schimbă în galben-verzui, prin adăugarea de suc gastric care conține acid.

## DETERMINAREA SÎNGELUI ÎN SUCUL GASTRIC

### Reacția Mayer

Reactivi: alcool acetic (100 ml alcool 96° + 2 ml acid acetic glacial); perhidrol ( $H_2O_2$  concentrație 34%)

### Reactivul Mayer

- 50 ml  $H_2O$  distilată
- 10 g KOH sau NaOH
- 1 g fenoltaleină
- 5 g zinc pulbere

### Modul de lucru:

La 2 ml suc gastric filtrat, fiert și apoi răcit se adaugă:

- 2 ml alcool acetic;
- 0,5 ml reactiv Mayer
- 2-3 picături  $H_2O_2$  20%

În prezența singelui se produce o colorație roșie.

## DETERMINAREA PIGMENTILOR BILIARI ÎN SUCUL GASTRIC

Prezența bilei dă sucului gastric o culoare verde caracteristică, cînd conține HCl, sau galbenă în lipsa acestuia. Pentru recunoașterea pigmentilor biliari se folosesc următoarele reacții de culoare:

### Reacția Gmelin

Reactivi: La 10 ml acid nitric-nitros se adaugă un mic cristal de nitrit de sodiu.

### Modul de lucru

- 10 ml suc gastric
- 2-3 ml acid nitric nitros

La limita de separare a celor 2 lichide apar inele colorate în galben, roșu, albastru, verde care pun în evidență prezența pigmentilor biliari.

### Reacția Grimbert

#### Reactivi:

- clorură de bariu 10%
- alcool 5% acidifat (95 ml alcool 96° + 5 ml HCl conc.)
- perhidrol.

**Modul de lucru:** într-un tub de centrifugă se pipetează suc gastric neutralizat cu soluție de NaOH 10%.....5 ml  
soluție de clorură de bariu .....5 ml

Se centrifughează iar precipitatului i se adaugă la cald în baie de apă 5 ml alcool acidificat, plus 3 picături  $H_2O_2$ .

În prezența pigmentilor biliari apare o colorație albastră-verde în lichidul alcoolic.

## EXAMENUL ENZIMATIC AL SUCULUI GASTRIC

### Determinarea pepsinei

Pepsina are proprietatea de a hidroliza proteinele la pH = 1,4-1,7 în aminoacizi.

#### Reactivi:

- albuș de ou fiert
- HCl N/10 și HCl 8 %



### XIX Modul de lucru:

Se folosesc 2 eprubete, una fiind proba iar cealaltă martorul.

|                   | proba              | martor             |
|-------------------|--------------------|--------------------|
| suc gastric       | 10 ml              | 10 ml              |
| albuș de ou fiert | cîteva mici bucăți | cîteva mici bucăți |
| HCl N/10          | 1—2 picături       | —                  |
| HCl 8%            | —                  | 1—2 picături       |

Eprubetele sînt astupate cu dop și ținute 3 ore la 37°C.

**Rezultate:** dacă în prima eprubetă digestia albuminelor de ou s-a terminat în 3 ore, activitatea pepsinei și HCl sînt normale. Dacă digestia nu s-a efectuat decît în a doua eprubetă, înseamnă că în suc gastric cantitatea de HCl este insuficientă.

Dacă nu s-a efectuat digestia nici în prima nici în a doua, suc gastric nu conține pepsină.

#### Determinarea labfermentului

Labfermentul provoacă în mediul acid sau neutru coagularea cazeinei din lapte.

**Reactivi:** lapte proaspăt fiert;  
soluție de clorură de calciu 1%

**Modul de lucru:** într-o serie de 6 eprubete se fac diluțiile de suc gastric de la 1/10 la 1/320 în volum de 1 ml. În fiecare eprubetă se adaugă:

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| lapte                | .....5 ml   |
| CaCl <sub>2</sub> 1% | .....2,5 ml |

Paralel se fac 2 martori:

1) 0,5 ml suc gastric fiert în prealabil pentru a distruge labfermentul + 4,5 ml H<sub>2</sub>O distilată

2) 5 ml H<sub>2</sub>O distilată.

Acești martori se tratează ca și probele. După 20' menținere în baie de apă la 40° se citesc rezultatele.

Martorii nu trebuie să prezinte nici un fel de coagulare.

În mod normal, diluția de 1/160 prezintă încă un coagul dens.

În achilia gastrică coagularea nu se produce în nici un tub.

### DUODENUL

Explorarea funcțională a duodenului nu poate avea la bază examenul lichidului duodenal, acesta fiind un amestec din salivă, suc gastric, bilă, secreție pancreatică, secreție intestinală și secreție proprie a mucoasei duodenale.

Secreția duodenală este alcătuită din:

— secreția care stimulează pe cale hormonală secreția biliară, pancreatică și intestinală;

— enterochinaza care transformă tripsinogenul pancreatic în tripsină;

— maltaza care acționează asupra glucidelor.

Recoltarea lichidului duodenal se face prin tubaj cu ajutorul unei sonde de cauciuc tip Einhorn sau cu sonde diferențiale prevăzute cu două sau trei căi, aplicînd proba Meltzer-Lyon. Cantitatea normală de lichid duodenal în 24 ore este de 1200 ml din care: secreția biliară reprezintă circa 700—800 ml și secreția pancreatică circa 300 ml. Digestia duodenală este reprezentată în tabelul LXXIX.

## Digestia duodenală

| Segment digestiv        | Proferment          | Activator                                    | Enzimă activă                                              | Substratul digestiei                                                        | Rezultatul digestiei                                                     |
|-------------------------|---------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Duoden (suc pancreatic) | Tripsinogen         | Enterokinază autocatabolic (urme tripsină)   | Tripsină                                                   | Proteină nativă<br>Proteaze<br>Peptone                                      | Polipeptide                                                              |
|                         | Chimotripsinogen    | Tripsină, autocatalitic (urme chimotripsină) | Chimotripsină                                              | Proteină nativă<br>Proteaze<br>Peptone                                      | Polipeptide                                                              |
|                         | Procarboxipeptidază | Tripsină                                     | Carboxipeptidază<br><br>Erepsină                           | Poliipeptide<br><br>Peptone                                                 | Peptide inferioare<br>Aminoacizi<br>Aminoacizi                           |
|                         |                     |                                              | Aminopeptidază<br>Nuclează<br>Amilază<br>Maltază<br>Lipază | Poliipeptidază<br><br>Acizi nucleici<br>Amidon<br>Maltază<br>Grăsimi neutre | Peptide<br>Aminoacizi<br>Nucleotide<br>Maltază<br>Glucoză<br>Acizi grași |

Lichidul duodenal fiind un amestec din mai multe secreții și neputându-se efectua un studiu izolat, în cele ce urmează se va da examenul macroscopic, microscopic și chimic al secreției biliare, secreție care reprezintă cca 66% din cantitatea totală de lichid duodenal.

Proba Meltzer-Lyon constă în introducerea sondei de cauciuc pe nemîncate, iar recoltarea primilor ml de suc duodenal (20—30) ml care se scurg în 10—15' reprezintă „bila A” de culoare galben-auriu.

Pentru obținerea „bilei B”, se injectează prin sondă, după recoltarea „bilei A”, 30—40 ml soluție 25%  $MgSO_4$ . Această soluție poate fi înlocuită printr-o injecție subcutanată de 2 ml pituitrină, hipofiză sau 1 mg histamină.

După 10—20' de la administrare volumul de 10—30 ml lichid scurs prin sondă reprezintă „bila B” de culoare galben-maron sau verde-închis, apoi urmează „bila C” de culoare galben-auriu, bila hepatică.

## EXAMENUL MACROSCOPIC AL BILEI

Variațiile de culoare la cele 3 bile sînt date de cantitățile de bilirubină. Bila B este cea mai închisă la culoare.

În tabelul LXXX sînt date concentrațiile celor 3 bile în unități Van der Berg.

Tabelul LXXX

## Concentratul celor 3 bile

|                      | Bila A     | Bila B     | Bila C    |
|----------------------|------------|------------|-----------|
| Unități Van der Berg | 12 unități | 60 unități | 6 unități |



## EXAMENUL MICROSCOPIC AL BILEI

Acest examen trebuie efectuat imediat după recoltarea bilei, deoarece celulele și mai ales lamblile sint distruse de prezența fermenților digestivi. Se centrifughează puternic, iar sedimentul se examinează la microscop.

În mod normal nu se pun în evidență elemente figurate. Rar se găsesc celule epiteliale, 1—2 leucocite mononucleare sau polinucleare.

Frecvențele cristale de colesterol bilirubinat și oxalat de calciu sint fără importanță dacă sint rare, dar dacă se prezintă dispuse în formațiuni strinse ele se interpretează ca microcalculi.

Cristalele de acizi grași trădează existența unei staze gastrice.

În cazuri patologice se găsește un număr mare de polinucleare care denotă existența unui proces inflamator. În duodenite și ulcerul duodenal, sedimentul de tip leucocitar indică o inflamație a căilor biliare sau un proces supurativ hepatic. În colecistite, leucocitele predomină în bila B, pe cînd în duodenite și inflamații ale căilor pancreatice ele predomină în bila A. Eozinofilele se întîlnesc în helmintiază. În angiocolite și în hepatite se mai găsesc în sediment cilindri mucinoși și cilindri biliari.

## CALCULI BILIARI

Calculii biliari se formează în căile biliare extrahepatice și mai ales în vezicula biliară. Ei pot fi simpli și micști.

Calculi simpli: — calculi de colesterol puri;

— calculi de bilirubină;

— calculi de carbonat de calciu.

Calculi micști: — calculi de calciu și colesterol;

— calculi de calciu și pigmenți biliari;

— calculi de calciu, colesterol și pigmenți biliari.

Calculii biliari sint spălați cu precauție, sint ușați la 105° și apoi studiați microscopic și chimic.

**Examenul macroscopic.** În primul rînd se numără apoi se observă forma, culoarea, aspectul, duritatea și structura calculilor.

Arderea într-un creuzet a unei mici porțiuni din calcul dă o orientare asupra componenței și anume:

— Calculii care conțin colesterol ard și se carbonizează.

— Calculii care conțin pigmenți biliari după ardere devin bruni-verzui.

— Calculii care conțin calciu după ardere devin albi-albăstrui.

**Examenul chimic.** Examenul se efectuează pe calculii sfărîmați aduși în stadiul de pulbere și constă în identificarea colesterolului, pigmenților biliari, carbonaților și fosfaților precum și a calciului.

Pentru identificarea colesterolului, a pigmenților biliari, a fosfaților și a calciului se face o soluție acetică, fierbîndu-se o jumătate de oră puțină pulbere în acid acetic 5%.

**Modul de lucru:** într-o capsulă de porțelan se pipetează

— *Colesterol* — soluție acetică ..... 0,5 picături

— cloroform..... 1 ml

— acid sulfuric concentrat .... 0,2 ml

La agitare pe pereții vasului cloroformul se colorează în roșu, acidul sulfuric în verde. Variația de culori indică prezența colesterolului.

— *Pigmenții biliari*: într-o eprubetă se pipetează:

- soluție acetică ..... 2 ml
- soluție de  $\text{NO}_3\text{K}$  0,5% ..... 0,1 ml.

Colorația verde-albastru indică prezența pigmentilor biliari.

— *Calciu*: într-o eprubetă se pipetează:

- soluție acetică ..... 1 ml
- soluție de acetat de sodiu 25% 1 ml
- soluție de oxalat de amoniu 5% 0,3 ml

Apariția unui precipitat indică prezența calciului. În supernatant se determină magneziu.

— *Magneziu*: într-o eprubetă se pipetează:

- supernatant ..... 1 ml
- soluție de amoniac concentrată 1 ml
- soluție de fosfat de sodiu 25% 0,5 ml

Prin frecare cu o baghetă se formează cristale caracteristice de fosfat de magneziu care indică prezența magneziului.

— *Fosfați*: într-o eprubetă se pipetează:

- soluție acetică ..... 1 ml
- reactiv sulfo-molibdenic ..... 2 ml

Culoarea galbenă indică prezența fosfaților.

— *Carbonați*:

- calculi sfărâmați ..... 0,5—1 g
- acid acetic conc. .... 5 ml

Apariția unei efervescente cu degajare de  $\text{CO}_2$  pune în evidență prezența carbonaților.

## INTESTINUL SUBȚIRE

Lichidul intestinal, cu rol digestiv important prin enzimele pe care le conține, este secretat de glandele intestinale. Acest lichid este un amestec de suc intestinal, gastric, pancreatic și biliar.

Recoltarea se execută cu ajutorul sondei Miller-Abott iar cantitatea normală este de 2 litri în 24 ore.

Lichidul intestinal conține un număr mare de enzime (tabelul LXXXI)

Tabelul LXXXI

Digestia în intestinul subțire

| Segmentul digestiv                     | Enzima activă                  | Substratul digestiv    | Rezultatul digestiei              |
|----------------------------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Intestinul subțire<br>(suc intestinal) | Aminopeptidază                 | Polipectide            | Peptide inferioare,<br>aminoacizi |
|                                        | Tripeptidaza                   | Tripeptide (specifice) | Aminoacizi                        |
|                                        | Dipeptidaza                    | Dipeptide (specifice)  | Aminoacizi                        |
|                                        | Imunopeptidaza (poli-<br>doza) | Dipeptid (specific)    | Aminoacizi                        |
|                                        | Nucleaza                       | Acizi nucleici         | Nucleotide                        |
|                                        | Maltaza                        | Maltază                | Glucoză                           |
|                                        | Lactaza                        | Lactază                | Glucosa și galactoză              |



care acționează asupra substanțelor proteice, asupra grăsimilor și asupra hidraților de carbon.

La nivelul intestinului subțire se face atât descompunerea substanțelor alimentare cât și resorbția substanțelor rezultate.

La trecerea conținutului din intestinul subțire în cel gros aproape nu mai există substanțe care s-ar putea absorbi, exceptând apa.

Albuminele se absorb sub forma aminoacizilor, glucidele sub formă de monozaharide, grăsimile sub formă de acizi grași și de glicerină. Tot în intestinul subțire se absorb vitaminele, apa și sărurile minerale.

Lichidul intestinal fiind un amestec de secreții explorarea funcțională a intestinului subțire nu poate avea la bază examenul lichidului intestinal.

## INTESTINUL GROS (COLON)

### ANALIZA MATERIILOR FECALE

Materiile fecale reprezintă produsul de excreție intestinală care se formează în intestinul gros din resturile bolului alimentar care vin din intestinul subțire. Sunt formate din substanțe alimentare nedigerate sau incomplet digerate, din celulele descuamate de pe mucoasa tubului și glandelor intestinale, microbi intestinali. În cazurile patologice materiile fecale pot conține: mucus, sânge, puroi, paraziți intestinali care pot fi văzute la examenul macroscopic.

Examinarea materiilor fecale este importantă putând da informații atât asupra digestiei cât și absorbției substanțelor alimentare.

Pentru informații corecte asupra digestiei și absorbției, bolnavul este supus în prealabil unui regim alimentar de probă care să conțină țesut conjunctiv, țesut muscular, grăsime, amidon și celuloză într-un raport bine stabilit. Regimul cel mai des întrebuintat este prinzul de probă „Gaultier“.

Prinzul de probă Gaultier se compune din: 500 ml lapte, 100 g piine albă, 50 g unt, 2 ouă, 100 g carne de vacă și 200 g cartofi. Pentru investigarea funcției de mobilitate a intestinului, bolnavul va ingera și 2 cașete de 0,3 g colorant carmin sau 1 g cărbune animal. Se notează timpul scurs între ingerarea prinzului de probă și eliminarea primului scaun colorat în roșu sau negru. În medie acest pasaj se face în 24—36 ore. În tulburări ale funcțiilor motorii intestinale această colorare a materiilor fecale apare abia după mai multe zile.

Recoltarea materiilor fecale se face într-un vas curat și uscat fără a se amesteca cu urina. Analiza materiilor fecale constă din examenul macroscopic, microscopic și chimic.

### EXAMENUL MACROSCOPIC

Cantitatea medie evacuată zilnic este de 150—200 g. Este redusă în cazul alimentării cu substanțe complet digerabile (ou, carne, unt, caș, făinoase) și abundentă în cazul regimului cu substanțe vegetale. Scaune abundente se întâlnesc și în cazurile când digestia și resorbția intestinală sunt deficiente

(pancreatită, colite, enterocolite, dispepsii de fermentație). În condiții fiziologice fecalele au forma cilindrică și culoarea brună din cauza stercobilinei, derivat al bilirubinei. Culoarea materiilor fecale depinde foarte mult și de acțiunea florei bacteriene.

## EXAMENUL MICROSCOPIC

Examenul microscopic reflectă digestia celor trei elemente fundamentale ale alimentației; proteine, grăsimi și glucide. Digestia substanțelor proteice poate fi apreciată după cantitatea și caracterul resturilor de fibre musculare, digestia grăsimilor după cantitatea de grăsimi neutre, acizi grași și săpunuri, iar digestia glucidelor după cantitatea de amidon (fig. 31).

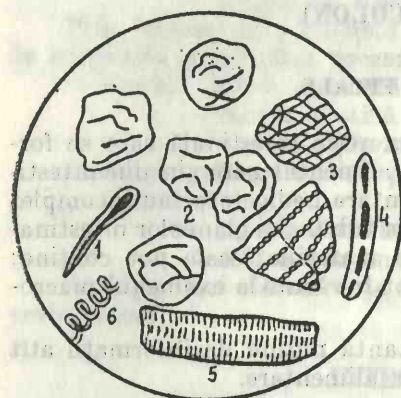


Fig. 31. — Digestia alimentelor (examen microscopic).

1 — păr vegetal; 2 — celulă de cartof;  
3 — membrane de cereale; 4 — floră iodofilă; 5 — fibre musculare; 6 — țesut conjunctiv.

Examenul microscopic al materiilor fecale se face pe preparate proaspete între lamă și lamelă folosind următoarele soluții:

1. — Soluție de clorură de sodiu 8 g % servind la pregătirea preparatului nativ;

2. — Soluție Lugol (soluție concentrată)  
iodură de potasiu ..... 2 g  
iod ..... 1 g  
apă distilată ..... 30 ml.

Soluția servește pentru punerea în evidență a amidonului și a anumitor microorganisme.

3. — Soluția Sudan III  
Sudan III ..... 2 g  
alcool 70% ..... 100 ml

sau

Sudan III ..... 2 g  
alcool 96° ..... 10 ml  
acid acetic conc. .... 90 ml.

Soluția servește pentru punerea în evidență a grăsimilor neutre.

4. — Soluția Albastru de Nil — este soluție apoasă saturată, servește pentru punerea în evidență a acizilor grași.

Preparatele proaspete se obțin în modul următor:

— pe 4 lame de sticlă se pune câte o mică porțiune din materiile fecale proaspete și se adaugă una din soluțiile următoare:

- ser fiziologic
- soluție Sudan III
- albastru de Nil
- soluție Lugol.

Se aplică apoi câte o lamelă exercitând o ușoară presiune digitală pînă la obținerea unui strat subțire și uniform. Lamele astfel pregătite sînt examinate rapid la microscop pentru:

- resturi alimentare;
- elemente de origine intestinală;
- cristale și detritus.



1. Resturi alimentare ca celuloza, fibrele musculare, țesutul conjunctiv, grăsimile, amidonul etc.

*Celuloza* este de 2 feluri, una digerabilă și alta nedigerabilă. Prezența celulozei nedigerate denotă un tranzit accelerat prin intestinul gros; în mod normal celuloza se digeră complet în colon.

*Fibrele musculare* se prezintă sub forma unor mici fragmente colorate în galben, mai mult sau mai puțin intens, în raport cu cantitatea de bilă din intestin. Cele digerate fără striatii, cele nedigerate cu striatii.

În cazuri patologice se întâlnesc numeroase fibre musculare atît de mari, încît se observă chiar cu ochiul liber. Digestia fibrelor musculare se face sub acțiunea sucului pancreatic. Prezența unei cantități mari de fibre nedigerate indică o insuficiență funcțională a pancreasului. O cantitate mare de fibre musculare mai poate fi constatată în cazul accelerării tranzitului piloro-intestinal.

*Țesutul conjunctiv* apare ca filamente cu structură fibroasă sau ca smocuri incolore însoțite uneori de fibre elastice gălbui. Ele diferă de mucusul cu care ar putea fi confundate prin faptul că acidul acetic 30% face ca mucusul să apară net iar țesutul conjunctiv mult mai pal.

Prezența țesutului conjunctiv la examenul microscopic nu are valoare mare de diagnostic deoarece poate exista și în mod normal.

La examenul macroscopic punerea în evidență a țesutului conjunctiv denotă o insuficiență gastrică (achilie), hipermobilitate.

*Grăsimile* sînt componente normale ale scaunului și se întâlnesc sub forma de grăsimi neutre, acizi grași și săpunuri (săruri de calciu și magneziu ale acizilor grași). În preparatul necolorat grăsimea neutră are de obicei aspectul unor picături rotunde și incolore sau al unor particule de diferite mărimi. Uneori picăturile au o formă alungită neregulată și sînt colorate în galben.

Acizii grași se întâlnesc: 1) sub forma unor ace lungi și fine, cristale cu virfurile ascuțite și formînd uneori mănunchiuri; 2) sub forma de grămăjoare; 3) sub forma de picături de diferite mărimi. Picăturile de acizi grași se deosebesc de picăturile de grăsimi neutre prin faptul că prezintă adesea (dar nu totdeauna) la periferie prelungiri aciculare sau spini. Săpunurile se întâlnesc sub forma de cristale și grămezi amorfe. Cristalele lor seamănă cu cristalele acizilor grași, dar sînt mai scurte și formează mai frecvent mănunchiuri. Astfel, atît grăsimile neutre, cît și acizii grași pot avea forma de picături; grăsimile neutre, acizii grași și săpunurile lor pot avea forma de grămezi amorfe iar acizii grași și săpunurile pot avea forme de ace.

Pentru diferențierea lor cel mai adesea se folosesc soluțiile Sudan III și albastru de Nil.

Soluția de Sudan III colorează grăsimile neutre în roșu-portocaliu pe cînd săpunurile nu le colorează.

Acizii grași sînt colorați în albastru închis cu soluția albastru de Nil și grăsimile neutre apar colorate în roz.

După colorarea acizilor grași cu albastru de Nil, examinarea trebuie făcută imediat, întrucît colorația dispăre foarte repede. Prin încălzire la flacără, grăsimile și acizii se topesc, formînd picături, iar din picăturile de acizi grași, prin răcire se pot forma cristale în formă de ace. Săpunurile se prezintă, fie sub formă de cristale, fie ca mase neregulate, fie forme variate. Eliminarea unei cantități mari de grăsimi indică o insuficiență pancreatică și biliară.

Sub influența sucului pancreatic și a bilei, grăsimile se emulsionează și apoi sint scindate în glicerină și acizi grași. Glicerina este resorbită imediat, pe cînd acizii grași sint insolubili și devin solubili sub acțiunea acizilor biliari.

**Amidonul.** Soluția Lugol colorează amidonul nemodificat în albastru iar amidonul parțial digerat în violet sau roșu și chiar în roșu închis pînă la aspect negricios. Dextrinele sint colorate în roșu-roz de către soluția Lugol. Amidonul nemodificat sau crud se prezintă sub forma de grăunțe rotunde sau ovale, pe cînd amidonul digerat își pierde structura. O cantitate mică de amidon se găsește și în materiile fecale normale. Cînd apare în cantitate mare, el indică un peristaltism accentuat în intestinul subțire și gros, îndeosebi în segmentul cecal.

2. **Elemente de origine intestinală:** epiteliile plate din regiunea anală, epiteliile cilindrice, leucocite, macrofage și mucus. Mucusul are aspect de fine flocoane înglobînd celulele epiteliale, leucocite și hematii, microbi, cristale și resturi alimentare. În general prezența mucusului în fecale denotă o stare patologică (inflamatorie) la nivelul mucoasei intestinale.

3. **Cristalele** nu prezintă valoare de diagnostic mare. Cristalele frecvente în materiile fecale sint fosfați de calciu sau amoniaco-magnezieni, cristale de colesterol, acizi grași și săpun, oxalați de calciu, precum și bilirubine și hematoidină.

**Cristalele de hematoidină** apar ca tablete romboide, ace sau prisme oblice cu raza romboidală, roșii-gălbui sau brune. Pentru a le deosebi de alte cristale turnăm peste preparat puțin amoniac: cristalele de hematoidină se dizolvă. Pentru a le interpreta ca datorite unei hemoragii pe traiectul tubului digestiv, trebuie ca bolnavul să nu consume carne timp de 3—4 zile, înainte de examinare.

**Detritusul.** Prin detritus se înțeleg particule morfologice mărunte, care constituie masa principală a fecalelor și este constituit din resturi mărunte de alimente, din microbi, epiteliu intestinal descuamat și modificat și alte particule foarte fine care și-au pierdut structura.

De asemenea se cere un frotiu colorat Gram pentru stabilirea raportului dintre flora Gram pozitivă și cea negativă, precum și un frotiu colorat cu Lugol pentru aprecierea abundenței florei iodofile. Prezența unei florei iodofile abundente denotă fie o fermentație exagerată, fie o evacuare rapidă a colonului ascendent.

#### EXAMENUL CHIMIC AL MATERIILOR FECALE

Acest examen constă în: determinarea componentelor normale ca: pigmenți biliari și a componentelor anormale ca: sînge și substanțe proteice.

De asemenea se determină și reacția materiilor fecale care în mod normal este neutră, examenul chimic se face fie pe porțiuni mici din bol fie pe omogenizate.

În general, pentru obținerea omogenizatului se procedează astfel: se ia un fragment mic din centrul bolului fecal și se pune într-un vas care conține un volum de apă distilată, de 5 ori mai mare față de fragment. Se fierbe pentru distrugerea oxidazelor leucocitare și se filtrează.



Filtratul poate fi folosit pentru:

### A) Punerea în evidență a pigmentilor biliari

Se face cu următoarele metode:

#### 1. Metoda cu sublimat

*Reactivi:* reactivul Triboulet, care conține:

- sublimat (biclorură Hg) ..... 3,5 g
- acid acetic glacial ..... 1 ml
- H<sub>2</sub>O distilată ..... 100 ml

Reactivul este filtrat după 24 ore.

*Modul de lucru:*

Bolul este omogenizat în reactivul Triboulet. După 1 oră la 37°C și 24 ore la temperatura laboratorului se citește rezultatele. Culoarea verde a supernatantului cit și a sedimentului indică prezența pigmentilor biliari (bilirubina).

Culoarea roșu-cărmiziu indică prezența stercobilinei și a stercobilinogenului.

#### 2. Metoda cu acetat de Zn

reactivul cu acetat de Zn:

- acetat de Zn ..... 10 g
- alcool etilic ..... 100 ml

reactivul cu iod:

- iod ..... 1 g
- alcool ..... 100 ml

*Modul de lucru:* bolul este omogenizat în reactivul cu acetat Zn și i se adaugă apoi câteva picături din soluția alcoolică de iod.

După 24 de ore supernatantul prezintă o fluorescență verde.

#### 3. Metoda cu perclorură de fier

În această reacție se folosește reactivul Fouchet:

- soluție perclorură de fier 1 g% în apă distilată
- HCl concentrat (d = 1,19).

*Modul de lucru:*

Bolului omogenizat în apă, i se adaugă:

— 5 ml HCl concentrat, se încălzește la 50°, timp de 5 minute, apoi se adaugă 2—3 picături perclorură de fier.

În prezența bilirubinei apare o colorație verde iar în prezența stercobilinei apare o colorație roșie.

### B) Punerea în evidență a substanțelor proteice

Materiile fecale nu conțin substanțe proteice în mod normal. Ele sînt puse în evidență prin reactivul Triboulet.

Reactivul Triboulet este același ca la punerea în evidență a pigmentilor biliari.

*Modul de lucru:* bolul este omogenizat în apă și repartizat în două eprubete:

— o eprubetă martor,

— o eprubetă probă.

În eprubeta probă se adaugă 2 ml reactiv Triboulet și se lasă în repaus pînă a doua zi.

În eprubeta 2 limpezirea supernatantului indică prezența substanțelor proteice. Ele trădează o inflamație sau o iritație gravă a mucoasei intestinului gros.

### C) Punerea în evidență a hemoglobinei

Principiul metodelor folosite în acest scop se bazează pe faptul că hemoglobina și derivații ei au proprietăți peroxidazice. Aceasta descompune  $H_2O_2$  cu eliberarea oxigenului activ care oxidează fenolftaleina, benzidina, tinctura de gaiac etc.

Metodele cunoscute sînt:

#### 1. Metoda Gregersen

*Reactivul Gregersen:*

|                    |         |
|--------------------|---------|
| benzidină cristale | 0,025 g |
| acid acetic 50 %   | 5 ml    |
| peroxid de bariu   | 0,1 g   |

*Modul de lucru:* o mică porțiune din bol este pusă direct pe lamă, apoi este tratată cu 1—2 picături reactiv Gregersen preparat proaspăt.

Rezultate: lama se colorează în albastru cînd materiile fecale conțin sînge.

#### 2. Metoda Weber

Reactivi: acid acetic glacial

eter

apă oxigenată 30%

soluție alcoolică de rășină de gaiac 2%.

*Modul de lucru:* bolului omogenizat în apă i se adaugă:

— 3 ml acid acetic glacial și

— 15 ml eter.

*Extractul eterat se împarte în 2 eprubete:*

|                             | Probă  | Martor |
|-----------------------------|--------|--------|
| extract eteric              | 5 ml   | —      |
| $H_2O_2$                    | 1—2 ml | 1—2 ml |
| soluție alcoolică de rășină | 0,5 ml | 0,5 ml |

Rezultate: prezența singelui produce o culoare albastru închis în eprubeta probă.

#### 3. a Metoda Adler

Reactivi: benzidină cristale

acid acetic 50%

$H_2O_2$  10%

Reactivul Adler: în 5 ml acid acetic 50% se dizolvă 0,025 g benzidină și se adaugă 2 ml  $H_2O_2$  10%.

*Modul de lucru:* bolul omogenizat în apă, fiert și filtrat, plus reactivul Adler dau o culoare albastră în prezența singelui.

#### 3. b. Metoda Adler rapidă

Într-o eprubetă se pune un virf de spatulă de benzidină pură într-un ml de acid acetic glacial, se agită pînă se dizolvă și se adaugă o cantitate mică din materiile fecale recoltate din mai multe porțiuni ale scaunului. Acestui amestec i se adaugă cîteva picături de apă oxigenată.



În prezența urmelor de singe apare o culoare albastră a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de singe.

#### 4. Metoda cu ortotoluidină

##### Reactivi:

- soluție ortotoluidină 4% în etanol
- acid acetic glacial
- $H_2O_2$  30%

Reactivul ortotoluidină: soluție de ortotoluidină 4% în etanol-acid acetic glacial (V/V).

**Modul de lucru:** bolului omogenizat în apă, fierț și filtrat, i se adaugă 4 picături reactiv ortotoluidină și 1 picătură apă oxigenată 30%.

Rezultate: apare o culoare verde-albastră în prezența singelui.

#### 5. Metoda Mayer

##### Reactivi:

- alcool acetic:
  - alcool 96° ..... 100 ml
  - acid acetic glacial ..... 2 ml
- $H_2O_2$  10%
- reactiv Mayer:
  - fenolftaleină ..... 2 g
  - KOH ..... 100 g
  - Zn pulbere ..... 10 g

##### Modul de preparare

Într-o capsulă de porțelan se cîntăresc 2 g de fenolftaleină, la care se adaugă 100 ml hidroxid de potasiu 20%. Amestecul se încălzește la fierbere pînă la dizolvare și apoi se adaugă treptat pulbere de zinc pînă la decolorare completă. Fenolftaleina roșie în mediul alcalin este redusă în fenolftaleină incoloră, sub influența hidrogenului provenit din acțiunea hidroxidului de potasiu asupra zincului. Decolorarea se face în maximum 10 minute, cu aproximativ 10 g pulbere de zinc.

Reactivul se filtrează și se conservă timp îndelungat cu puțină pulbere de zinc pe fundul vasului.

##### Modul de lucru

La circa 5 g materii fecale, omogenizate cu 10 ml apă distilată, se adaugă 2 cm<sup>3</sup> alcool acetic. Se agită, se fierbe, pentru distrugerea oxidazelor leucocitare, se filtrează și se repartizează în 2 eprubete.

|               | Probă  | Martor |
|---------------|--------|--------|
| filtrat       | 10 ml  | —      |
| alcool acetic | 1,5 ml | 1,5 ml |
| reactiv Mayer | 0,5 ml | 0,5 ml |
| $H_2O_2$      | 0,5 ml | 0,5 ml |

Culoarea roșu-violet indică prezența singelui în materiile fecale.

## CAPITOLUL VI

### SÎNGELE SUBSTANȚE ORGANICE

#### DOZAREA PROTEINELOR

Metodele colorimetrice de determinare a proteinelor în ser se bazează

pe proprietățile compușilor cu legături peptidice

$$\begin{array}{c} R_1 \\ | \\ CH \\ / \quad \backslash \\ NH \quad C \\ || \quad | \\ O \quad R_2 \end{array}$$

de a reacționa cu ionul cupru în soluție alcalină, dînd săruri complexe de culoare violetă.

Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația proteinelor.

Metodele folosite sînt:

#### 1. Metoda biuretului

##### Reactivul biuret:

- sulfat de cupru ..... 1,5 g (dizolvat în 500 ml H<sub>2</sub>O)
- tartrat dublu de sodiu și potasiu (sare Seig-  
nette) ..... 6 g (dizolvat în 200 ml H<sub>2</sub>O)
- hidroxid de sodiu ..... 30 g (dizolvat în 300 ml H<sub>2</sub>O)
- iodură de potasiu ..... 1 g
- apă pînă la ..... 1 000 ml

Modul de lucru: în 2 eprubete se pipetează:

|                             | Probă | Martor |
|-----------------------------|-------|--------|
| — probă (1–10 mg) proteină) | 1 ml  | —      |
| — apă                       | —     | 1 ml   |
| — reactiv biuret            | 4 ml  | 4 ml   |



Se agită și se lasă 30' la temperatura camerei. Se citesc extincțiile la  $\lambda = 540-560\text{m}\mu$ , cuva de 1 cm.

**Calcul:** Concentrația proteinei din probă se obține prin interpolarea extincțiilor citite într-o curbă etalon. Curba este efectuată cu ajutorul a cinci diluții obținute dintr-o soluție stoc conform tabelului LXXXII. Soluția conține 10 mg proteină pură (albumină cristalizată) pe ml. Curba de etalonare poate fi efectuată și cu ser uman.

Tabelul LXXXII

| Concentrația albuminei<br>în mg/ml       | ml din soluția stoc | ml $\text{H}_2\text{O}$ | Extincția |
|------------------------------------------|---------------------|-------------------------|-----------|
| 10                                       | 1                   | —                       | 0,515     |
| 8                                        | 0,8                 | 0,2                     | 0,410     |
| 6                                        | 0,6                 | 0,4                     | 0,315     |
| 4                                        | 0,4                 | 0,6                     | 0,215     |
| 2                                        | 0,2                 | 0,8                     | 0,110     |
| 1                                        | 0,1                 | 0,9                     | 0,055     |
| $F = \frac{C}{E} = \frac{4}{0,215} = 18$ |                     |                         |           |

Se recomandă păstrarea soluției stoc la minus  $4^\circ\text{C}$  deoarece cu timpul se denaturează.

Pe abscisă se trec cantitățile în mg ale soluțiilor diluate, iar pe ordonată extincțiile citite. Rezultanta este o dreaptă. În acest caz, calculul se poate simplifica înmulțind extincția cu factorul de pantă, care este raportul dintre concentrație și extincție.

Volumul final la care se diluează soluția colorată a etaloanelor trebuie să fie același ca la probă.

## 2. Metoda Weichselbaum

### Reactivi

#### Reactiv Weichselbaum:

sare Seignette (tartrat dublu de potasiu și sodiu) 45 g dizolvate în 200 ml apă distilată

hidroxid de sodiu 30 g dizolvat în 200 ml apă

sulfat de cupru 15 g dizolvat în 200 ml apă

iodură de potasiu 5 g

Se completează cu apă până la 1 000 ml.

**Modul de lucru:** în două eprubete, proba și martorul, se pipetează:

|                 | Probă  | Martor |
|-----------------|--------|--------|
| apă distilată   | 7,8 ml | 8 ml   |
| ser uman        | 0,2 ml | —      |
| r. Weichselbaum | 4 ml   | 4 ml   |

După 30' se citesc probele la spectrofotometru  $\lambda = 550\text{m}\mu$ , în cuva 1 cm

### Calcul:

Concentrația proteică a probei de cercetat se obține fie prin interpolarea extincțiilor citite într-o curbă etalon, fie înmulțind extincțiile citite cu factorul.

$$F = 20 \text{ g\% ml ser} = E \times F$$

Cantitățile la probă și martor pot fi reduse la 1/2.

### 3. Metoda Lowry

*Reactivi:*

*Reactiv cupric alcalin:*

Sol. A —  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10% dizolvat în soluție de  $\text{NaOH}$  0,5 N.

Sol. B —  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5 g% dizolvat într-o soluție de citrat de sodiu 1 g% (în locul citratului se poate folosi aceeași concentrație de tartrat de K). În cazul din urmă reactivul e mai stabil.

Înainte de întrebuintare se amestecă 10 părți reactiv A + 1 parte reactiv B.

Reactiv Folin

În balon cu gît rodat de 2 l se cîntăresc:

— 100 g wolfram de Na ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )

— 25 g molibdat de Na ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )

se adaugă 700 ml apă, iar după dizolvare se pun:

— 50 ml acid fosforic 85%

— 100 ml acid clorhidric concentrat.

Balonul se montează la un refrigerent cu reflux și se lasă să fiarbă 10 ore.

Se adaugă apoi:

150 g sulfat de litiu dizolvat parțial în apă, brom cîteva picături.

Se mai fierbe fără reflux 15'.

Se diluează la 1 litru și se filtrează. Se păstrează în sticlă brună.

În momentul întrebuintării se diluează:

1 parte reactiv cu 10 părți apă distilată.

*Modul de lucru:*

în două eprubete se pipetează:

|                                   | Probă | Martor |
|-----------------------------------|-------|--------|
| — probă (5—100 $\gamma$ proteină) | 1 ml  | —      |
| — apă                             | —     | 1 ml   |
| — reactiv cupric                  | 1 ml  | 1 ml   |

Se țîn 10 minute la temperatura laboratorului.

|                              |      |      |
|------------------------------|------|------|
| — reactiv Folin diluție 1/10 | 3 ml | 3 ml |
|------------------------------|------|------|

Se țîn 10 minute în baie de apă la 50°C.

Citirea la  $\lambda = 500 \text{ m}\mu$  în cuvă de 1 cm.

*Calcul*

Cantitatea de proteină g% ml se obține prin interpolarea extincțiilor citite în curba etalon.

### 4. Metoda gravimetrică

*Principiul* constă în precipitarea proteinelor totale cu sulfat de amoniu.

Precipitatul se usucă și se cîntărește.

*Reactivi*

— tampon acid acetic

acetat de Na. 3  $\text{H}_2\text{O}$  ..... 118 g

apă distilată ..... 500 ml

acid acetic glacial ..... 56 ml

apă distilată ..... 1 000 ml



- soluție saturată de sulfat de amoniu
  - sulfat de amoniu ..... 100 g
  - apă distilată la fierbere ..... 125 ml
- alcool 96°
- eter
- amestec alcool-eter 3 la 1

## DETERMINAREA PROTEINELOR TOTALE

*Modul de lucru:* într-o eprubetă se pipetează:

|                        | Probă   |
|------------------------|---------|
| ser .....              | 1 ml    |
| tampon acetat .....    | 3 ml    |
| sulfat de amoniu ..... | 0,5 ml. |

Eprubetele se introduc pentru 1 oră în baie de apă la fierbere. Filtrarea se face prin 2 filtre cantitative puse unul în altul (cintărite).

— Se spală precipitatul cu apă distilată pînă ce filtratul nu mai conține urme de sulfat de amoniu. Controlul se efectuează cu clorură de bariu.

— Precipitatul se spală cu alcool, eter și apoi se lasă la 105° pînă la greutate constantă.

— Se cîntăresc cele 2 filtre iar diferența reprezintă proteinele totale la 1 ml ser.

$\text{g proteine \% ml ser} = \text{valoarea obținută prin cîntărire} \times 100$

### Determinarea albuminelor

*Modul de lucru*

În 2 eprubete de centrifugă se pipetează:

|                                      | Probă | Martor |
|--------------------------------------|-------|--------|
| ser .....                            | 1 ml  | —      |
| apă distilată .....                  | 2 ml  | 3 ml   |
| soluție saturată de sulfat de amoniu | 3 ml  | 3 ml   |

-- Se lasă 3 ore și apoi se centrifughează.

— La 3 ml supernatant se adaugă 3 ml tampon acid acetic și se continuă operațiile identic ca pentru proteinele totale.

$\text{g albumină \% ml ser} = \text{grame cîntărite} \times 100$

### Determinarea globulinelor

Grame globuline la % ml ser = diferența dintre proteine totale și albumină.

### Dozarea gravimetrică a proteinelor

*Principiul:* proteinele totale precipită în prezența alcoolului la o anumită concentrație.

*Reactivi:*

— alcool 96°

— hîrtie de filtru cantitativă

— eprubete cu diametrul de 3 cm, baghetă de sticlă.

### Metode:

Într-o eprubetă de sticlă rezistentă la căldură se pun 10 ml alcool 96° și cu ajutorul unei pipete de 1 ml se toarnă serul picătură cu picătură, cât mai aproape de suprafața alcoolului.

Eprubeta se pune la fiert în apă timp de trei minute (eprubetele se astupă cu un dop de tifon), apoi precipitatul format se triturează cu ajutorul unei baghete și se filtrează prin două filtre cantitative, tarate la balanța analitică. Se spală eprubeta de două ori cu câte 20 ml alcool încălzit și cu 150 ml apă distilată fierbinte. Apoi filtrele cu precipitat se usucă în pupinel la temperatura de 100°C, timp de 90 minute și se recintăresc.

$g \text{ proteină } \% \text{ ml ser} = g_{F_1} - g_{F_2} \times 100$

$g_{F_1}$  = greutatea filtrului cu proteine

$g_{F_2}$  = greutatea filtrului simplu.

### 5. Metoda absorbției în U.V.

**Principiu:** proteinele prezintă o absorbție caracteristică a luminii ultraviolete care este maximă la  $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ . Absorbția se datorește tirozinei și triptofanului iar într-o măsură mai mică fenilalaninei.

**Aparatura:** spectrofotometru de diferite tipuri Zeiss, Beckman — se folosesc în mod obișnuit cuvele de 1 ml de cuarț.

**Modul de lucru:** probele sînt diluate în funcție de domeniul curbei etalon stabilită anterior și în care se vor interpola citirile efectuate la spectrofotometru U.V. Se pot determina cantitățile de proteină sub 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Avantajul acestei metode constă în faptul că se folosesc cantități foarte mici din proba de cercetat. Determinarea concentrației de proteină nu este influențată de prezența sulfatului de amoniu în probă. În schimb acizii nucleici, bazele azotate, nucleotidele, amidonul influențează valoarea proteinelor, ele fiind substanțe capabile să absoarbă lumina la această lungime de undă.

**Valorile normale ale proteinelor serice** sînt aproximativ aceleași la toate metodele.

Proteine totale 6,5—8,2 g% ml ser

Albumine totale 4,5—5,5 g% ml ser

Globuline 1,5—3,4 g% ml ser

Raportul  $\frac{\text{albumine}}{\text{globuline}} = 1,6\text{—}2,2$

### Proteine totale

Valori crescute sînt întîlnite în bolile infecțioase cronice, în pierderi de apă (diaree, vărsături, poliurie, deshidratare, diabet insipid; mielom multiplu, boala Waldenström).

Valori scăzute sînt întîlnite în edeme nefrotice, anemii, hemoragii acute, ciroze, inanție, tumori maligne.

### Albuminele

Sînt scăzute în nefrite însoțite de albuminurii, hemoragii, inanție, supurații cronice, hepatite cronice, ciroze hepatice, stări de șoc.

### Globulinele

Sînt crescute în tumori maligne, nefroze, în inflamațiile și infecțiile cronice, în graviditate, leziuni hepatice.

La o scădere a albuminelor corespunde o creștere a globulinelor și invers.

De obicei creșterea globulinelor și scăderea albuminelor determină o accelerare a vitezei de sedimentare a eritrocitelor.



## DOZAREA FIBRINOGENULUI

### 1. Metoda Vincent

**Principiul:** plasma tratată cu sulfat de sodiu în anumită proporție prezintă o turbiditate proporțională cu cantitatea de fibrinogen. Recoltarea singelui se face pe substanțe sau soluții anticoagulante.

#### Reactivi:

1. sulfat de sodiu ..... 10,5 g

apă ..... 100 ml

Reactiv ce poate fi conservat la  $+4^{\circ}\text{C}$  timp de 30 zile.

#### 2. ser fiziologic:

NaCl ..... 9 g

apă ..... 1 000 ml

### 3. soluție Wintrobe (soluție anticoagulantă):

oxalat de amoniu ..... 1,2 g

oxalat de potasiu ..... 0,8 g

apă distilată ..... 100 ml

#### Modul de lucru:

În două eprubete se pipetează:

|                       | Probă  | Martor |
|-----------------------|--------|--------|
| plasmă .....          | 0,5 ml | 0,5 ml |
| sulfat de sodiu ..... | 5 ml   | —      |
| ser fiziologic .....  | —      | 5 ml   |

Se agită puțin și se lasă 30 minute la temperatura laboratorului.

Se citește la  $\lambda = 520 \text{ m}\mu$  cuvă de 1 cm.

Calcul:  $\text{mg\% ml plasmă} = E \times 2 \times F$

E = extincția

F = factor

Etalonarea se face cu o soluție de plasmă a cărei concentrație în fibrinogen a fost determinată prin metoda gravimetrică.

Eroarea metodei este de  $\pm 15\%$ .

Este o metodă foarte rapidă, ușor de aplicat pentru determinările în serie și nu necesită aparatură și reactivi speciali.

### 2. Metoda gravimetrică

**Principiul:** fibrinogenul din plasmă în prezența clorurei de calciu trece în fibrină care poate fi dozată prin reacția biuretului.

#### Reactivi:

#### 1. soluție coagulantă:

$\text{CaCl}_2$  sicc. .... 1,25 g

NaCl ..... 8 g

apă ..... 1 000 ml

#### 2. soluție NaOH N

#### 3. soluție NaCl: 9 g/1 000 ml

#### 4. reactiv Biuret:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ..... 1,5 g

tartrat Na și K ..... 6 g

NaOH ..... 30 g

iodură K ..... 5 g

apă ..... 1 000 ml

5. soluție etalon de albumină 4 g‰.

*Modul de lucru:* la 5 ml soluție coagulantă ținută 5 minute la 37°C se adaugă 0,5 ml plasmă, se agită, se lasă la baie la 37°C timp de 10 minute. Cu o baghetă se desprinde cheagul.

Se adaugă 5 ml soluție NaCl, se agită, se centrifughează și se îndepărtează supernatantul.

Se spală cheagul cu circa 20 ml NaCl și se trece pe hîrtie de filtru. Cheagul se usucă la 56°C și apoi se tratează cu reactiv Biuret în felul redat mai jos:

|                                             | Probă | Etalon | Martor |
|---------------------------------------------|-------|--------|--------|
| — cheag                                     | cheag | —      | —      |
| — NaOH                                      | 1 ml  | —      | —      |
| 10 minute la baie de apă (60—70°C). Răcire. |       |        |        |
| — soluție etalon                            | —     | 0,5 ml | —      |
| — NaCl                                      | —     | 0,5 ml | 1 ml   |
| — reactiv Biuret                            | 3 ml  | 3 ml   | 3 ml   |

După 30 minute se citesc extincțiile probei și a etalonului față de martor la  $\lambda = 555$  m $\mu$  cuvă 1 cm.

Calcul:

$$\frac{EP}{EE} \times 4 = \text{g fibrinogen la 1 000 ml plasmă.}$$

Valori normale:

2 — 4 g fibrinogen la 1 000 ml plasmă.

**Variații fizio-patologice ale fibrinogenului:**

Hipofibrinogenemiile (valori sub 2 g‰) sînt întîlnite în hepatoplazii severe (ciroze, hepatite, hemopatii — leucoze acute în special cu promielocite —, sindroame de proteoliză acută prin coagulare diseminată).

Hiperfibrinogenemiile (valori peste 5,5 g‰) se întîlnesc în infecții acute localizate sau generalizate (nefrite cronice, stări postoperatorii, Hodgkin etc). Produși de degradare ai fibrinogenului, vezi addendum.

## TESTE DE DISPROTEINEMIE

Testele de disproteinemie denumite incorect teste hepatice pun în evidență modificări ale funcției proteinoformatoare, a sistemului reticulo-histocitar, țesut care răspunde prin modificări nespecifice în numeroase maladii. Ele sînt rezultatul diminuării unor factori stabiliizați (albumine) sau creșterii unor factori precipitanți ( $\gamma$  globuline). Prin faptul că fiecare test se pozitivează în urma modificărilor unor anumite fracțiuni proteice există discordanțe între teste. Ele au valoare prin faptul că indică care fracțiune este modificată și de aceea trebuie executate în grup.

Pot să nu concorde cu proteinograma care dă modificări cantitative, în timp ce testele de disproteinemie au valoare calitativă.

### 1. Testul Takata-Ara modificat

*Principiul.* În cazul creșterii globulinelor sau scăderii albuminelor proteinele serice precipită în prezența sublimatului, carbonatului și clorurii de sodiu.



### Reactivi

— soluție carbonat-clorură

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| clorură de sodiu .....         | 5 g      |
| carbonat de sodiu anhidru .... | 10 g     |
| apă distilată .....            | 1 000 ml |

— soluție mercurică

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| clorură mercurică ..... | 0,2 g  |
| soluție NaCl‰ 9% .....  | 100 ml |

### Modul de lucru:

|                                | Probă   | Martor  |
|--------------------------------|---------|---------|
| ser uman .....                 | 0,15 ml | —       |
| soluție carbonat-clorură ..... | 2,5 ml  | —       |
| soluție mercurică .....        | 1 ml    | —       |
| apă .....                      | —       | 3,65 ml |

60' la temperatura laboratorului. Se citește absorbția procentuală la  $\lambda = 660$  m $\mu$  față de apă, cuvă 1 cm.

### Rezultate

|          |                |         |             |
|----------|----------------|---------|-------------|
| 100%—80% | — negativ      | 70—50%  | ++ pozitiv  |
| 80 %—70% | — slab pozitiv | sub 50% | +++ pozitiv |

### 2. Testul Mac Lagan (timol)

Principiul: Soluția tampon pH=7,8 saturată cu timol produce precipitarea serurilor disproteinemice datorită creșterii gamaglobulinelor, a betaproteinelor sau scăderii albuminelor.

Reactivi: soluție timol (soluție stock):

|                                 |          |
|---------------------------------|----------|
| — timol cristalizat p.a.....    | 10 g     |
| — alcool 96° .....              | 100 ml   |
| — tampon veronal pH = 7,8       |          |
| — acid dietilbarbituric .....   | 2,76 g   |
| — dietil barbiturat de sodiu .. | 2,06 g   |
| — apă .....                     | 1 000 ml |

— soluție timol pentru lucru

În balon cotate de 100 ml se pune 1 ml soluție de timol și 90 ml tampon veronal pH = 7,8. Se încălzește pe baie de apă la 70—80°, agitând până la clarificarea completă a soluției. După răcire se completează la semn cu soluție tampon.

— clorura de bariu (pentru scara turbidimetrică).

|                                                        |        |
|--------------------------------------------------------|--------|
| clorură de bariu cristalizată 2 H <sub>2</sub> O ..... | 1,15 g |
| apă .....                                              | 100 ml |

— acid sulfuric N/5

Modul de lucru: în 2 eprubete se pipetează:

|                       | Proba   | Martor* |
|-----------------------|---------|---------|
| Ser nehemolizat ..... | 0,05 ml | —       |
| Reactiv Timol .....   | 3 ml    | 3 ml    |
| Apă .....             | —       | 0,05 ml |

Se agită și se citesc după 30' la temperatura laboratorului la  $\lambda$  470 m $\mu$  cuva 1 cm sau față de o scară turbidimetrică în care caz rezultatele se exprimă în unități Mac Lagan.

\* Martor pentru reactiv

Pregătirea scării: 3 ml din soluția de clorură de bariu se aduc la % cu ac. sulfuric N/5. Soluția prezintă o turbiditate de 20 unități Mac Lagan. Din această soluție se prepară apoi etaloanele de turbiditate prin diluare cu acid sulfuric N/5 (tabelul LXXXIII).

Tabelul LXXXIII

Etaloanele de turbiditate

| Etalon | ml soluție standard | ml acid sulfuric N/5 | Unități M.L. |
|--------|---------------------|----------------------|--------------|
| 1      | 10                  | —                    | 20           |
| 2      | 9                   | 1                    | 18           |
| 3      | 8                   | 2                    | 16           |
| 4      | 7                   | 3                    | 14           |
| 5      | 6                   | 4                    | 12           |
| 6      | 5                   | 5                    | 10           |
| 7      | 4                   | 6                    | 8            |
| 8      | 3                   | 7                    | 6            |
| 9      | 2                   | 8                    | 4            |
| 10     | 1                   | 9                    | 2            |

Tuburile (etaloanele) sînt închise la flacără și pot fi utilizate timp îndelungat

Se agită bine tuburile și se citește extincția fiecărui etalon față de apă distilată, trasîndu-se o curbă. Transformarea extincțiilor probelor măsurate în unități Mac Lagan se face utilizînd curba obținută.

Se poate utiliza și factorul de pantă realizat din curba respectivă.

Valori normale: 0—4 unități Mac Lagan

5—20 unități fotometrice Pulfrich.

Valori crescute se întîlnesc la bolnavii de ficat, reumatism poliarticular acut, boala Nicholas-Fabre, cancer, tuberculoză, malarie, endocardită malignă.

Reacția timol poate servi la diferențierea icterului hepatic de icterul prin obstrucție; în primul caz valorile sînt crescute, iar în al doilea valorile sînt normale.

### 3. Testul cu apă distilată

Apa distilată are o acțiune precipitantă asupra unui ser cu conținut bogat în globuline în special  $\gamma$  și  $\beta$ .

**Reactivi:**

— Soluție NaCl 9 g $\%$  ml apă distilată

— Apă distilată

**Modul de lucru:** în 2 eprubete se pipetează:

|                 | Probă  | Martor |
|-----------------|--------|--------|
| apă bidistilată | 5 ml   | —      |
| ser cercetat    | 0,1 ml | 0,1 ml |
| NaCl            | —      | 5 ml   |

Citire după 24 ore cu ochiul liber în comparație cu tubul martor notîndu-se rezultatul + sau —, sau pe scara Mac Lagan. Valori normale — 0 — 4 U.M.L.



#### 4. Testul Gross modificat

Reacția este considerată ca un test de leziune parenchimatoasă. Indică o creștere a globulinelor și o scădere a albuminelor.

Reactivi:

— Soluție Hayem:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| sublimat (biclaurură de mercur)  | 0,5 g  |
| sulfat de sodiu cristalizat..... | 5 g    |
| clorură de sodiu .....           | 2 g    |
| apă distilată .....              | 200 ml |

Modul de lucru: în 2 eprubete se pipetează:

|                     | Probă  | Martor |
|---------------------|--------|--------|
| Ser .....           | 0,5 ml | —      |
| Apă distilată ..... | —      | 0,5 ml |
| Soluție Hayem ..... | 0,5 ml | 0,5 ml |

Agitare

#### Rezultate

intens pozitiv = +++ . Dacă precipitatul apare imediat sau în 2 ore

pozitiv = ++ . Dacă precipitatul apare în primele 4 ore.

slab pozitiv = +

negativ = — După 24 ore „ „ „ 24 ore

negativ = — După 24 ore nu apare precipitat.

#### 5. Testul Kunkel

Principiu: un ser care are fracțiunea  $\gamma$  crescută precipitată prin tratare cu o soluție diluată de sulfat de zinc la pH = 7,5.

Reactivi:

soluție de sulfat de Zn în tampon veronal pH = 7,5:

— tampon veronal:

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| — acid dietilbarbituric .....  | 0,3 g    |
| — dietilbarbiturat de sodiu .. | 0,2 g    |
| — apă .....                    | 1 000 ml |

Reactiv Kunkel

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| sulfat de $Zn \cdot 7H_2O$ ..... | 0,024 g  |
| tampon veronal .....             | 1 000 ml |

Modul de lucru: în 2 eprubete se pipetează:

|                      | Probă  | Martor |
|----------------------|--------|--------|
| ser .....            | 0,1 ml | —      |
| reactiv Kunkel ..... | 6 ml   | 6 ml   |
| ser fiziologic ..... | —      | 0,1 ml |
| Se agită.            |        |        |

Consumul de ser și reactivi fiind prea mare se poate lucra cu cantitățile pe jumătate.

După 30' citirea turbidității se face pe scara Mac Lagan. Se poate citi și la fotometru filtru  $L_1$  (albastru) pe scara neagră. Valorile citite se scad din 100. Rezultatul se dă în unități fotometrice (UF).

Valori normale:

Scara Mac Lagan : 2—10 U.M.L.

## 6. Testul Wunderly sau Wuhrmann

**Principiul:** un ser care conține albumine scăzute, cu conținutul crescut de  $\alpha$  și  $\gamma$  globulină produce în prezența sulfatului de cadmiu o reacție de turbiditate.

**Reactivi:**

— soluție de sulfat de cadmiu

sulfat de cadmiu  $8H_2O$  ..... 0,4 g

apă ..... 100 ml

**Modul de lucru:** în 2 eprubete se pipetează:

|                        | Probă  | Martor |
|------------------------|--------|--------|
| ser .....              | 0,4 ml | —      |
| ser fiziologic .....   | —      | 0,4 ml |
| sulfat de cadmiu ..... | 0,2 ml | 0,2 ml |

După 5' se citește turbiditatea.

Reacție intens pozitivă: floculare imediată sau pînă la 1'.

Reacție pozitivă: floculare pînă la 5'.

Reacție slab pozitivă: floculare slabă după 5'.

Reacție negativă: lipsă de floculare; amestecul rămîne clar.

Testul crioglobulinelor și testul SIA, vezi addendum.

Relațiile între testele de disproteinemie și fracțiunile proteice albumina și globulina alfa, beta, gama sînt redată în tabelul LXXXIV

Tabelul LXXXIV

| Reacția                                            | Albumine | Globuline | alfa ( $\alpha$ ) | beta ( $\beta$ ) | (gama) $\gamma$ |
|----------------------------------------------------|----------|-----------|-------------------|------------------|-----------------|
| Wuhrmann ( $CdSO_4$ )                              | —        | —         | +                 | —                | +               |
| Mac Lagan (timol) (interferează și lipoproteinele) | —        | —         | —                 | +                | +               |
| Kunkel ( $Zn SO_4$ )                               | —        | —         | —                 | —                | +               |
| Takata Ara                                         | —        | —         | —                 | —                | —               |
| Apă distilată                                      | —        | —         | —                 | +                | +               |

## DOZAREA AZOTULUI AMINIC

### a) Metoda Pope-Stevens

Această metodă se bazează pe dozarea iodometrică a complexului cupric cu azotul aminic.

**Reactivi**

1) clorură de cupru 0,16 M

$CuCl_2 \cdot H_2O$  ..... 27,3 g

apă distilată ..... 1 000 ml



2) reactiv fosfat trisodic

|                                            |          |
|--------------------------------------------|----------|
| fosfat disodic $2\text{H}_2\text{O}$ ..... | 64,5 g   |
| apă distilată .....                        | 500 ml   |
| după dizolvare se adaugă:                  |          |
| NaOH .....                                 | 7,2 g    |
| apă se completează până la ..              | 1 000 ml |

3) tampon borat:

|                                                                    |          |
|--------------------------------------------------------------------|----------|
| $\text{B}_4\text{O}_7\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ..... | 57,21 g  |
| apă .....                                                          | 1 500 ml |

După dizolvare se adaugă:

|                   |          |
|-------------------|----------|
| HCl N .....       | 100 ml   |
| apă până la ..... | 2 000 ml |

4) Suspensie de fosfat de cupru:

- 1 volum clorură de cupru (1)
- 2 volume soluție de fosfat trisodic (2)

se agită și se adaugă:

- 2 volume tampon borat (3)

5) Timolftaleină 0,1% în alcool 50%

|                     |        |
|---------------------|--------|
| timolftaleină ..... | 0,1 g  |
| alcool 50% .....    | 100 ml |

6) Tiosulfat de sodiu N/100

7) Acid acetic glacial

8) Iodură de K cristale

**Modul de lucru:** într-un balon cotate de 50 ml se pipetează:

|                                                                       |        |
|-----------------------------------------------------------------------|--------|
| ser .....                                                             | 5 ml   |
| timolftaleină .....                                                   | 4 pic. |
| Na OH N până la culoarea slab albastră suspensie fosfat de cupru..... | 30 ml  |

se completează la semn cu apă distilată

Se amestecă și se filtrează:

Într-un balon Erlenmayer se pipetează:

|                                                              |        |
|--------------------------------------------------------------|--------|
| filtrat .....                                                | 10 ml  |
| acid acetic glacial .....                                    | 0,5 ml |
| Se adaugă:                                                   |        |
| Soluție amidon .....                                         | 4 pic. |
| Iodură de K cristale .....                                   | 1 g    |
| Se titrează cu tiosulfat de sodiu 0,01 N până la decolorare. |        |

**Rezultate:**

1 ml soluție tiosulfat Na N/100 = 0,28 mg N—aminic

**Calcul:**

$$\text{mg NH}_2\% \text{ ml ser} = n \times 0,28 \times 100 = n \times 28$$

$$n = \text{nr. ml de tiosulfat N/100.}$$

b) Dozarea azotului aminic cu ninhidrină, vezi addendum.

**DOZAREA AZOTULUI TOTAL**

a) Metoda titrimetrică (microdozarea Kjeldahl)

Această metodă constă în transformarea azotului organic în azot anorganic (realizat prin mineralizare) sub formă de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Azotul anorganic, în prezența alcalilor, pune în libertate amoniacul, care este dozat titrimetric.

Aparatura folosită:

- 1) Balon Kjeldahl de 50—100 ml
- 2) Aparat Parnas-Wagner (fig. 32)

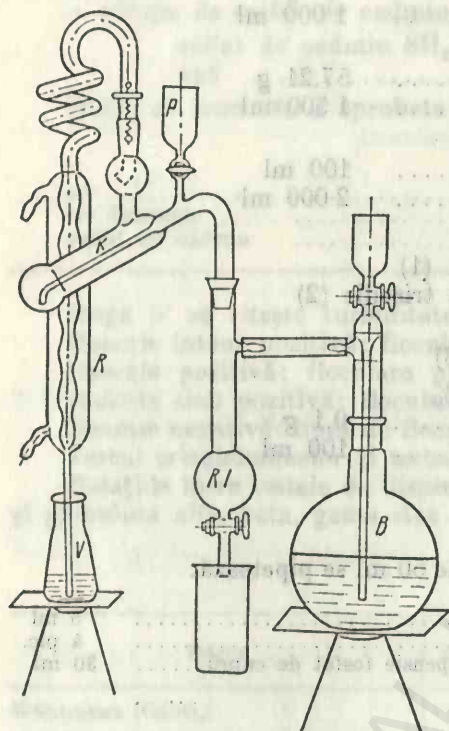


Fig. 32. — Aparat Parnas — Wagner.

B = balon generator; R.I. = recipient intermediar; P = pilnie; K = balon Kjeldahl; R = refrigerent; V = vas colector (Erlenmayer).

Înainte de această operație se atașează sub refrigerent (R) un vas Erlenmayer colector (V) de 100 ml care conține:

|                            |              |
|----------------------------|--------------|
| acid clorhidric N/70 ..... | 10 ml        |
| roșu metil .....           | 1—2 picături |

În balonul Kjeldahl (K) al aparatului în care s-a introdus proba, tot prin pilnia P se mai adaugă:

|                     |            |
|---------------------|------------|
| NaOH 40% .....      | 6 ml       |
| Fenolftaleină ..... | 2 picături |

Se închide pilnia P a aparatului și se distilează 20 minute.

Balonul colector (V) în care s-a făcut distilarea se încălzește și se titrează cu soluția de NaOH N/70.

Martorul conține în loc de ser, apă distilată, modul de lucru fiind identic cu al probei.

#### Reactivi:

- 1) Soluție roșu metil 0,1% în alcool 70°.
- 2) Acid sulfuric N/70
- 3) NaOH N/70
- 4) NaOH 40%
- 5) Soluție fenolftaleină 1 g% în alcool 70°.
- 6) Oxalat de K cristalizat
- 7) Acid sulfuric conc. p.a. (D = 1,84).

Modul de lucru: mineralizarea se face la flacără într-un balon Kjeldahl în care se pune:

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| ser (plasmă) .....             | 1 ml  |
| acid sulfuric concentrat ..... | 1 ml  |
| oxalat de potasiu .....        | 0,5 g |

Se pune o pilnie în gîtul balonului și se așază în poziție înclinată la flacără mică. Balonul se menține astfel pînă la o mineralizare completă. În acest caz nu mai iese fum și conținutul devine incolor.

După răcire, conținutul se trece în aparatul Parnas-Wagner prin pilnia P, spălînd de 2—3 ori cu apă distilată balonul în care s-a făcut mineralizarea.



**Calcul:**

mg azot la 100 ml ser =  $(n_1 - n_2) \times 0,2 \times 100$ .

$n_1$  = ml NaOH N/70 întrebuițați la titrarea probei

$n_2$  = ml NaOH 1/70 întrebuițați la titrarea matorului

$$\text{Factor} = \frac{\text{GM (greutatea moleculară) azot}}{\text{normalitate}} = \frac{14}{70} = 0,2.$$

b) Metoda colorimetrică, vezi addendum.

## DOZAREA UREEI

### 1. Metoda cu xanthidrol

**Principiu:** ureea precipită cantitativ și specific cu xanthidrol în mediu de acid acetic, sub formă de dioxanthyluree, greutatea acestui complex fiind de 7 ori mai mare decât a ureei.

**Reactivi**

Reactiv Tanret

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| clorură mercurică .....   | 2,71 g |
| iodură de potasiu .....   | 7,2 g  |
| acid acetic glacial ..... | 66 ml  |
| apă distilată .....       | 100 ml |

Soluție xanthidrol 10% în alcool metilic.

**Modul de lucru:** în eprubete de centrifugă se pipetează:

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Ser .....            | 1 ml   |
| Reactiv Tanret. .... | 1 ml   |
| Centrifugare         |        |
| Supernatant .....    | 1 ml   |
| Acid acetic .....    | 1 ml   |
| xanthidrol.....      | 0,2 ml |

Se agită cu o baghetă. Se lasă în repaus acoperit cu o sticlă de ceas. Apoi se filtrează concentric, pe o suprafață mică, pe o bucată de hîrtie de filtru pusă la trompă. Se spală precipitatul cu alcool metilic, apoi se ia precipitatul și este pus pentru o oră la etuvă, la 100°. După uscare se detașează discul mic și se cîntărește.

**Calcul:**

$$g \text{ uree } \% \text{ ml} = \frac{P}{7} \times \frac{100}{n}$$

P = gr. discului de dioxanthyluree

n = nr. de ml ser utilizați

### 2. Metoda cu diacetilmonoximă

**Principiu:** ureea condensează cu diacetilmonoxima în mediu acid, dînd un compus colorat.

Varianta A.

**Reactivi:** acid tricloracetic soluție 10%

diacetilmonoximă

diacetilmonoximă ..... 5 g

acid acetic 5% ..... 1 000 ml

antipirina

antipirina ..... 2 g

acid sulfuric 20% ..... 1 000 ml

standard uree

uree ..... 50 mg

acid benzoic, soluție saturată .... 100 ml

sau

acid tricloracetic 10% ..... 100 ml

**Modul de lucru:** în eprubete de centrifugă se pipetează:

|                     | Probă  | Standard | Martor |
|---------------------|--------|----------|--------|
| apă                 | 5,0 ml | 5,0 ml   | 5,1 ml |
| ser (plasmă, singe) | 0,1 ml | —        | —      |
| acid tricloracetic  | 5,0 ml | 5,0 ml   | 5,0 ml |
| standard            | —      | 0,1 ml   | —      |

Se amestecă, după 5' se centrifughează.

Dacă se lucrează cu ser sau plasmă clară și nehemolizată se poate face o simplă diluare fără deproteinizare conform datelor de mai jos:

|                               | Probă   | Standard | Martor |
|-------------------------------|---------|----------|--------|
| clorură de sodiu 9‰           | 10,0 ml | 10 ml    | —      |
| ser (plasmă)                  | 0,1 ml  | —        | —      |
| standard                      | —       | 0,1 ml   | —      |
| Supernatant sau diluție (ser) | 0,5 ml  | —        | —      |
| standard                      | —       | 0,5 ml   | —      |
| NaCl 9‰                       | —       | —        | 0,5 ml |
| diacetilmonoxima              | 0,5 ml  | 0,5 ml   | 0,5 ml |
| antipirină                    | 4 ml    | 4 ml     | 4 ml   |

Se amestecă și se ține 50' în baie la fierbere și apoi se răcește.

Citire la spekol sau fotocolorimetru  $\lambda = 460 \text{ m}\mu$  în cuva 1 cm

Varianta B

**Reactivi:**

— clorură de sodiu 9%

— reactiv combinat:

72 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $D = 1,84$ ) + 115 ml acid ortofosforic ( $D = 1,71$ )

Se toarnă încet în 380 ml apă distilată

Se dizolvă 145 mg clorură ferică anhidră sau 486 mg  $\text{FeCl}_3$  cu  $6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  și 30 mg tiosemicarbazidă



- Se păstrează la frigider  
 — diacetilmonoximă 0,6 g în 10 ml acid acetic 5%  
 — standard uree 50 mg % ml acid tricloracetic 10%

#### *Tehnică*

Serul se diluează 1/10 în ser fiziologic (0,1 ml ser + 0,9 ml ser fiziologic)

|                  | Probă | Standard | Blanc |
|------------------|-------|----------|-------|
| Ser diluat       | 0,1   | —        | —     |
| Standard         | —     | 0,1      | —     |
| Apă distilată    | —     | —        | 0,1   |
| Reactiv combinat | 2,5   | 2,5      | 2,5   |
| Diacetilmonoximă | 0,5   | 0,5      | 0,5   |

Se fierbe 8 minute.

Se răcește, citire între 5 minute — 20 minute la spekol  $\lambda = 525 \text{ m}\mu$ .

#### *Calcul:*

Calcul mg uree/100 ml ser (plasmă—singe) = EP/ES  $\times$  50

Valori normale 16—40 mg % ml ser.

#### 3 a) Metoda cu urează

*Principiu:* ureaza acționează specific asupra ureei, ducând la eliberare de amoniac care este apoi determinat cu reactivul Nessler.

*Reactivi* — Tampon acetat pH = 6,5

acetat de sodiu anhidru ..... 1,5 g

acid acetic glacial ..... 1 ml

apă ..... 100 ml

— Soluție standard de uree

uree ..... 100 mg

apă ..... 100 ml

— Soluție urează

urează ..... 100 mg

tampon EDTA până la ..... 50 ml

— tampon EDTA pH = 6,5

EDTA (sare sodică) ..... 20 g

apă distilată ..... 1,5 l

NaOH 1N ..... cca 40 ml

apă ..... până la 2 000 ml

— Soluție de deproteinizare

Soluție ZnSO<sub>4</sub> ..... 10 g %

Soluție NaOH ..... 0,5 N

Reactiv Nessler

iodură mercurică ..... 50 g

iodură de potasiu ..... 25 g

apă ..... 350 ml

hidroxid de sodiu ..... 100 g

Se completează cu apă la 500 ml.

— Soluție clorură de sodiu 9‰.

*Modul de lucru:* în eprubete se pipetează:

|                    | Probă  | Martor | Standard | Blanc  |
|--------------------|--------|--------|----------|--------|
| — Ser fiziologic   | 3 ml   | 3,5 ml | 3 ml     | 3,5 ml |
| — Soluție tampon   | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml   | 0,5 ml |
| — Ser              | 0,5 ml | 0,5 ml | —        | —      |
| — Soluție ureează  | 0,5 ml | —      | 0,5 ml   | 0,5 ml |
| — Soluție standard | —      | —      | 0,5 ml   | —      |

Se menține sistemul 20' la 50—55° în baia de apă

|                             |        |        |        |        |
|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|
| — Soluție ZnSO <sub>4</sub> | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| — Soluție NaOH              | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |

Omogenizare și centrifugare, se lucrează pe supernatant

|                 |        |        |        |        |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| Apă distilată   | 11 ml  | 11 ml  | 11 ml  | 11 ml  |
| Supernatant     | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| Reactiv Nessler | 1 ml   | 1 ml   | 1 ml   | 1 ml   |

Reactivul Nessler se adaugă strict înaintea citirii. Citirea la  $\lambda = 410$  cuva de 1 cm.

$$\text{Calcul: mg uree \% ml ser} = \frac{E_P - E_M}{E_S - E_B} \times 40$$

Se poate face și o curbă cu o soluție standard de uree.

Valori normale:

20 mg — 40 mg % ml ser.

3 b. Metoda Berthelot, vezi addendum.

4 a. Metoda cu hipobromit de sodiu (Kowarski) și 4b vezi addendum.

Ureea [ $O = C - (NH_2)_2$ ] este descompusă cu ajutorul unei soluții alcaline de hipobromit de sodiu în  $N_2$ ,  $CO_2$  și  $H_2O$ .

$CO_2$  este adsorbit de hidroxidul de sodiu care este în exces, iar volumul azotului degajat se măsoară volumetric.

*Reactivi:* 1. Soluție saturată de clorură de sodiu și sulfat de potasiu:

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| 1 — sulfat de potasiu | 150 g    |
| clorură de sodiu      | 350 g    |
| apă distilată         | 1 000 ml |

2 — Hidroxid de sodiu 33%

3 — Brom

4 — Acid tricloracetic 20%

*Aparatura.* Dozarea se face în ureometrul Kowarski (fig. 33). Aparatul se compune dintr-un tub în formă de U, care este divizat în trei părți prin 2 robinete, cel de la partea superioară avînd 2 căi, iar cel inferior 3 căi. Sub robinetul superior, tubul subțire are o capacitate de 1 ml și este divizat în fracțiuni de 0,2 ml. Spre partea inferioară tubul se lărgeste și este divizat în zecimi de ml. Tubul

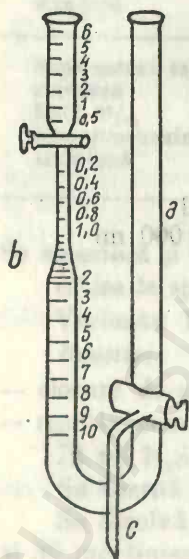


Fig. 33. — Aparatul Kowarski.

a = braț de umplere; b = braț gradat pentru citirea rezultatelor; c = braț de scurgere.



receptor este divizat deasupra robinetului în același mod. Robinetul cu 3 căi are un tub de scurgere lateral, astfel încît cu ajutorul lui se poate lăsa să curgă afară lichidul din tubul stîng sau drept al ureometrului sau să se asigure comunicația între cele două tuburi.

**Modul de lucru:** se măsoară 2,5 ml ser sau sînge într-o eprubetă. Datorită marii sale puteri de difuziune, ureea este repartizată egal în plasmă și globule. Se adaugă 2,5 ml acid trichloracetic 20%. Se agită amestecul, se filtrează printr-un filtru mic cu diametrul de 3—4 cm sau se centrifughează. Se umple ureometrul cu reactiv (1). Se deschide întîi robinetul de sus, iar cel de jos se fixează astfel încît cele două brațe să fie în comunicație, iar comunicarea cu tubul de scurgere să fie izolată. Se toarnă reactiv 1 prin brațul a pînă trece peste robinetul de sus. Se închide robinetul și se asigură cu ajutorul robinetului cu trei căi comunicația cu tubul de scurgere. În acest fel comunică brațul b cu tubul de scurgere și se formează astfel aici o presiune negativă. Se îndepărtează lichidul rămas din tubul gradat de deasupra robinetului de sus, cu ajutorul unei pipete. Se spală acest tub cu puțină apă distilată, care se îndepărtează tot cu pipeta. Se toarnă apoi filtratul trichloracetic și se deschide încet robinetul de sus și se lasă să curgă exact 2,5 ml filtrat în partea inferioară a tubului stîng. Se îndepărtează cu pipeta restul de filtrat, se spală, ca mai sus cu apă distilată pentru a îndepărta restul de filtrat și se îndepărtează apa cu pipeta, se repetă spălarea. Într-un cilindru gradat se prepară soluția de hipobromit. La 6 ml hidroxid de sodiu 33% se adaugă 12 picături de brom cu ajutorul unei sticle picătoare. Se agită ușor amestecul. Soluția de hipobromit de sodiu se introduce în partea de sus a brațului stîng b. Se deschide robinetul și se lasă să se scurgă 5—6 ml reactiv (cantitatea depinde de conținutul în uree).  $N_2$  care se dezvoltă împinge soluția sulfat de potasiu și clorură de sodiu, care se scurge prin tubul c. Se așteaptă 10 minute pînă ce s-a terminat degajarea de  $N_2$ .

Dacă prin lichid sînt răspîndite bule de gaze care nu se strîng la un loc cu volumul de gaz principal, se scoate aparatul de pe suport, avînd robinetele perfect închise și se răstoarnă încet pentru a permite bulelor să se ridice la suprafață.

Pentru a citi volumul de azot care s-a produs în tub, se procedează în modul următor: se întoarce robinetul cu 3 căi astfel ca să asigure comunicarea celor două brațe între ele. Deoarece gazul trebuie măsurat la presiunea atmosferică se toarnă în tubul b soluție Kowarski pînă sus. În acest mod lăsăm lichidul din brațul drept b să se scurgă prin d, pînă se stabilește același nivel ca în brațul stîng a. Se notează exact cantitatea de gaz degajat, adică volumul de gaz din tubul a.

**Rezultate:** se caută în tabel cifra care corespunde temperaturii și presiunii barometrice din timpul determinării. Cu această cifră se multiplică cifra găsită la dozare.

În lipsa barometrului se înmulțește de obicei volumul de gaz citit cu factorul 2. Dacă s-a lucrat cu 5 ml filtrat trichloracetic în loc de 2,5 ml se mai înmulțește cu 2 iar dacă s-a lucrat cu 1,25 ml filtrat trichloracetic, factorul se înmulțește cu 4.

Pentru controlul aparatului și al reactivilor se face o probă-martor, lucrînd cu o cantitate de soluție a cărei concentrație în uree este cunoscută.

Dacă la  $n$  diviziuni de azot degajat corespunde cantitatea de uree cunoscută, atunci la  $n'$  diviziuni ale probei de cercetat corespunde  $x'$  g uree

$$n = \dots\dots\dots \text{g uree}$$

$$n' = \dots\dots\dots x' = \text{g uree}$$

$$x' = \frac{n' \text{ g uree}}{n} = \text{g uree la } 1000 \text{ ml.}$$

**Observații:** în loc de a se prepara extemporaneu soluția de hipobromit din brom și hidroxid de sodiu se va utiliza următoarea formulă care evită manipularea frecventă a bromului și este mai economică:

Soluția A:

bromură de potasiu..... 2 g

brom ..... 4 g

apă distilată..... 80 ml

Soluția B: hidroxid de sodiu 20%

Soluția A se conservă la frigider. La întrebuințare se amestecă în părți egale soluția A + soluție B.

*Spălarea aparatului*

După dozare se scurge lichidul din brațul stîng, deschizînd robinetul superior și se așază robinetul inferior cu punctul negru în jos. Cînd lichidul este îndepărtat se spală de cîteva ori cu apă. Aparatul trebuie golit imediat, bine spălat, căci altfel se fixează dopurile și nu se mai desfac.

*Valori normale*

mg uree % ml ser = 10 — 40 mg

În cazul metodei cu hipobromit de sodiu (metoda Kowarski) valorile normale sînt între: 10—50 mg% ml ser.

Concentrația ureei este foarte variată și strîns legată de regimul alimentar precum și de vîrstă.

Patologic creșterea ureei poate fi de origine renală sau extrarenală.

Azotemia renală este întîlnită în glomerulonefrită cronică și acută, nefroangioscleroza benignă sau malignă, nefropatiile tubulare toxice, tuberculoza renală, tumori renale, rinichi polichistice, hidronefroze, hipertrofie de prostată, calculoza și alte obstacole mecanice.

Azotemia extrarenală corespunde unui hipermetabolism proteic avînd însă obligatoriu o componentă renală de origine ischemică.

La bolnavii cu insuficiențe renale acute sau cronice ea este utilă permițînd aprecierea gradului de lezare a parenchimului renal.

Ureea scade în insuficiența hepatică gravă (ciroză) și crește în nefrita acută.

4 b. Metoda cu hipobromit de sodiu modificată, vezi „Addendum“.

5. Metoda cu dimetilglioxină, vezi „Addendum“.

## DOZAREA ACIDULUI URIC

### 1. Micrometoda Brown

**Principiul:** acidul uric în mediu alcalin reduce acidul fosfowolframic în albastru de wolfram. Intensitatea culorii complexului este proporțională cu cantitatea de acid uric din ser. Cofeina, compușii sulfhidrilici (glutalion, cisteină, ergotioneină) și acidul ascorbic de asemenea dau o reacție, a cărei interferență este neglijabilă pentru determinarea acidului uric în ser.



**Reactivi:** — Reactiv fosfotungstic

tungstat de sodiu..... 50 g  
fosfat disodic anhidru..... 10 g  
apă..... 150 ml

Se încălzește pînă la dizolvare și se adaugă 12,5 ml  $H_2SO_4$  ( $d = 1,84$ ). Balonul se adaptează la refrigerent, se fierbe 1 oră, după răcire se completează cu apă pînă la 500 ml. Reactivul trebuie să fie incolor și să nu reacționeze cu soluția de cianură-uree.

— Reactivul cianură-uree: se amestecă în momentul întrebuițării părți egale din:

soluție de cianură de sodiu 12%

soluție de uree 50%

— Soluție stoc de acid uric:

acid uric .....0,200 g

carbonat de litiu .....0,30 g

apă caldă ..... 100 ml

Se agită pînă la dizolvare și se adaugă:

apă .....200 ml

formol. 40%..... 20 ml

acid sulfuric N ..... 15 ml. Se completează cu apă

distilată pînă la 1000 ml.

Reactivul se păstrează la întuneric.

— Soluția standard pentru lucru se obține prin diluția de 1/50 din soluția stoc.

Această soluție conține 4 mg acid uric/1000.

— tungstat de Na 10%.

— acid sulfuric 2/3 N

**Modul de lucru:** în eprubete de centrifugă se pipetează:

|                           | Probă  | Standard | Blanc |
|---------------------------|--------|----------|-------|
| — ser .....               | 0,1 ml |          |       |
| — apă distilată .....     | 1,5 ml |          |       |
| — tungstat de sodiu ..... | 0,2 ml |          |       |
| — $H_2SO_4$ 2/3N .....    | 0,2 ml |          |       |

agitare și centrifugare

|                             |      |      |      |
|-----------------------------|------|------|------|
| standard .....              | —    | 1 ml | —    |
| supernatant .....           | 1 ml | —    | —    |
| apă distilată .....         | 1 ml | 1 ml | 2 ml |
| soluție uree-cianură .....  | 4 ml | 4 ml | 4 ml |
| reactiv fosfotungstic ..... | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

Se completează cu apă la 10 ml și se citește la  $\lambda = 680$  m $\mu$ , cuva 1 cm.

Curba etalon se obține tratind în aceleași condiții 4—5 diluții preparate din soluția standard:

## 2. Metoda Heilmayer

*Principiu:* același ca în cazul metodei Brown.

*Reactivi:*

— Acid sulfuric ..... 0,085 N.

— tungstat (wolfram) de sodiu.... 10%

— Reactiv fosfo-wolframic:

wolfram de sodiu ..... 25 g

apă ..... 20 ml pentru dizolvare

acid fosforic d 1,71 ..... 20 ml

Fierbere 4 ore în refrigerent cu reflux după răcire se adaugă apă pînă la 250 ml.

— Tampon pH  $\approx$  12,5;

glicocol ..... 3 g

NaOH 1 N ..... 100 ml

— Standard stock = 1 mg acid uric/ml

acid uric ..... 100 mg

carbonat de litiu..... 50 mg

apă ..... 20 ml

se încălzește la 60°

apă ..... 30 ml

formaldehidă 40% ..... 2,5 ml

acid acetic glacial ..... 0,3 ml

apă pînă la ..... 100 ml.

Soluția standard de lucru conține 5 mg acid uric % ml

Se diluează 0,5 ml standard stock la 10 ml apă.

*Modul de lucru:* în eprubete de centrifugă se pipetează:

|                                                              | Probă  | Standard | Blanc   |
|--------------------------------------------------------------|--------|----------|---------|
| acid sulfuric 0,085 N                                        | 4 ml   | 4 ml     | —       |
| ser                                                          | 0,5    | —        | —       |
| standard de lucru                                            | —      | 0,5 ml   | —       |
| se amestecă bine                                             |        |          |         |
| wolfram                                                      | 0,5 ml | 0,5 ml   | —       |
| se centrifughează                                            |        |          |         |
| supernatant                                                  | 2,5 ml | 2,5 ml   | —       |
| apă                                                          |        |          | 2,5     |
| tampon                                                       | 0,5 ml | 0,5 ml   | 0,5 ml. |
| Se amestecă și se lasă 1 minut la temperatura laboratorului. |        |          |         |
| Reactiv fosfowolframic                                       | 0,1 ml | 0,1 ml   | 0,1 ml  |

Agitare. După 15 minute citire la  $\lambda = 710$  m $\mu$ , cuve de 1 cm.

*Calcul:*

$$\text{mg acid uric/100 ml ser} = \frac{EP}{ES} \times 5$$



#### 4. Metoda Heilmeyer simplificată

##### Reactivi:

- acid tricloracetic 20%
- carbonat de sodiu 40%
- reactiv fosfowolframic (identic folosit la metoda Heilmeyer).
- standard acid uric 5 mg% ml (identic metoda Heilmeyer).

##### Modul de lucru:

În eprubete de centrifugă se pipetează:

|                    | Probă  | Standard | Blanc |
|--------------------|--------|----------|-------|
| acid tricloracetic | 4 ml   | 4 ml     | —     |
| ser                | 0,5 ml | —        | —     |
| standard           | —      | 0,5 ml   | —     |

Se centrifughează

|                   |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|
| supernatant       | 2,5 ml | 2,5 ml | —      |
| apă               | —      | —      | 2,5 ml |
| carbonat de sodiu | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |

Se amestecă și se lasă 1 minut la temperatura laboratorului.

|                        |        |        |        |
|------------------------|--------|--------|--------|
| reactiv fosfowolframic | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
|------------------------|--------|--------|--------|

Agitare. După 15 minute se citesc extincțiile la  $\lambda = 710 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm.

Se poate citi numai față de apă distilată și folosi factorul obținut dintr-o curbă realizată cu cel puțin 3 diluții din soluția stoc a acidului uric.

##### Calcul:

$$\text{mg acid uric/100 ml ser} = \frac{EP}{ES} \times 5$$

#### 3. Metoda Grigaut-Laudat

**Principiul:** același ca în cazul metodei Brown

**Reactivi:** — Soluție acid tricloracetic 20%

— Soluție fosfowolframat de sodiu

wolframat de sodiu ..... 100 g

acid fosforic (d=60%) ..... 80 ml

apă distilată ..... 700 ml

se fierbe cu refrigerent ascendent 2 ore

După răcire se completează cu:

apă la ..... 1000 ml

— Soluție etalon de acid uric 2,5 mg%

— Soluție A — fosfat monosodic .... 0,25 g

fosfat disodic ..... 2,25 g

apă distilată fierbinte până la 250 ml

— Soluție B — acid uric ..... 0,025 g

apă distilată ..... 5 ml

— Soluție C — acid tricloracetic .. 20 g

apă distilată ..... 100 ml

Se adaugă soluția A fierbinte peste soluția B și apoi 250 ml apă distilată. Se răcește și se completează la 1000 ml cu soluție C.

— Soluție carbonat de sodiu 22%

*Modul de lucru:* în eprubete de centrifugă se pipetează:

|                                               | Probă  | Etalon | Martor |
|-----------------------------------------------|--------|--------|--------|
| ser                                           | 2 ml   | —      | —      |
| acid tricloracetic                            | 2 ml   | —      | —      |
| agitare 5', repaus, centrifugare sau filtrare |        |        |        |
| filtrat sau supernatant                       | 2 ml   | —      | —      |
| etalon                                        | —      | 2 ml   | —      |
| carbonat de sodiu                             | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   |
| reactiv fosfowolframic                        | 0,3 ml | 0,3 ml | 0,3 ml |
| apă distilată                                 | 5,7 ml | 5,7 ml | 7,7 ml |

Se agită și se lasă în repaus 5'.

Se citește la  $\lambda = 630 \text{ m}\mu$ , cuva 1 cm.

*Calcul*

$$g \text{ acid uric la } 100 \text{ ml/ser: } \frac{E \text{ probei}}{E \text{ etalon}} \times 2,5$$

### 5. Metoda cu fenantrolină

*Principiu:* acidul uric formează liganzi cu ionii metalici. Metoda se bazează pe reducerea ionului feric în ion feros, care este evidențiat prin reacția de culoare cu ortofenantrolină.

*Reactivi:*

1. Acid maleic 0,1 M ajustat la un pH 5,3 cu hidroxid de sodiu soluție N. Această soluție se adaugă soluției de acid maleic înainte de a se aduce la semn în balon cotat de 1000 ml cu apă bidistilată.

2. Fenantrolină hidroclorică 12,9 g/l

3. Soluție de clorură ferică 5,5 g/l, căreia i se adaugă 1,5 ml acid clorhidric concentrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

4. Reactivul de lucru: se prepară extemporaneu din soluțiile 1, 2 și 3:

— 3 ml acid maleic (sol. 1)

— 0,1 ml ortofenantrolină (sol. 2)

— 0,1 ml clorură ferică (sol. 3)

pentru o singură probă se respectă ordinea amestecării celor trei reactivi (1+2+3) și nu invers. Se poate păstra 6 ore și se prepară în funcție de numărul probelor de analizat.

5. Acid tricloracetic 20% folosit pentru deproteinizare.

6. Acid uric p.a. necesar pentru prepararea soluției etalon.

7. Carbonat de sodiu anhidru 12 mg/100 ml.

8. Ser uman normal 100 ml necesar pentru prepararea soluției etalon și a serului uman diluat (nu se folosesc seruri icterice și hemolizate).

9. Ser uman normal diluat: 4 volume ser + 1 volum apă bidistilată.

10. Soluția etalon: într-un pahar Berzelius de 100 ml se introduc 12 mg carbonat de sodiu anhidru, care se solvă în 10 ml apă bidistilată prin agitare și după completa dizolvare a substanței se introduce 20 mg acid uric la care se mai adaugă 10 ml apă bidistilată (total 20 ml apă bidistilată). Dizolvarea



se face la cald prin agitare continuă (până la 95°C). După răcire se trece soluția într-un balon cotat de 100 ml și se completează la semn cu *ser uman normal*

### *Tehnica de lucru:*

**Varianta 1:** pentru serurile normale care nu necesită deproteinizare:

|                           | Probă  |
|---------------------------|--------|
| ser de cercetat           | 0,1 ml |
| reactivi de lucru (nr. 4) | 3 ml   |

Se agită bine și se lasă 5 minute la temperatura camerei

Se face citirea probelor după cele 5 minute față de reactivul de lucru la lungimea de undă = 500 mμ în cuvă de 10 cm.

Culoarea nu este stabilă mai mult de 10 minute de la adăugarea reactivului de lucru, de aceea citirea probelor se va face în decursul următoarelor 5 minute după pauză.

**Varianta 2:** pentru serurile care necesită deproteinizare: icterice și hemolitice.

|                        | Probă  |
|------------------------|--------|
| ser de cercetat        | 1 ml   |
| acid tricloracetic (5) | 0,5 ml |

### Agitare și centrifugare

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| supernatant           | 0,5 ml |
| carbonat de sodiu (7) | 0,5 ml |

Agitare și menținere la 37°C timp de 15 min.

|                      |        |
|----------------------|--------|
| amestec              | 0,2 ml |
| reactiv de lucru (4) | 3 ml   |

Agitare și pauză 5 minute la temperatura camerei.

Se face citirea probelor în decurs de 5 minute (a nu se depăși 10 minute de la adăugarea reactivului de lucru), la lungimea de undă 500 mμ în cuva de 1 cm față de reactivul de lucru.

### *Trasarea curbei de etalonare*

Se prepară trei concentrații de acid uric conform tabelului:

|                             | Eprub. 1 | Eprub. 2 | Eprub. 3 |
|-----------------------------|----------|----------|----------|
| Etalon acid uric 20 mg%(10) | 2 ml     | 4 ml     | 6 ml     |
| Ser uman normal diluat (9)  | 8 ml     | 6 ml     | 4 ml     |

Se agită bine fiecare eprubetă și în continuare se lucrează după varianta 1 și 2, descrise mai sus, lucrând în paralel și o probă din serul uman normal diluat. Citire după 5 minute față de reactivul de lucru.

Extincția serului normal diluat (eprub. 0), se scade din extincția celor trei concentrații de etalonare, deoarece în prepararea soluției etalon (10) s-a utilizat ser uman normal.

Se trasează curba pe hirtie milimetrică sau se poate determina factorul de pantă.

Serurile cu concentrații mai mari de 18 mg% se vor repeta determinările după diluarea prealabilă a serului de cercetat, iar la calcul se va ține seama de diluția respectivă.

#### Valori fiziologice:

|          |          |
|----------|----------|
| Femei:   | 4—6 mg % |
| Bărbați: | 4—7 mg % |

Valori crescute se găsesc în nefrite acute sau subacute, gută, leucemii, anemii pernicioase, tuberculoză renală, artrite deformante, eclampsii, decompensări cardiace și intoxicații cu plumb.

### DOZAREA CREATININEI

**Principiu:** creatinina, anhidrida acidului metilguanidin acetic, reduce acidul picric în acidul picramic de culoare galben-portocaliu (reacția Jaffé). În afară de creatinină, reacția Jaffé este pozitivată nespecific de acidul ascorbic, piruvatul, acetona, acidul diacetic, levuloza, glucoza, proteinele, paraamino-hipuratul etc.

Pentru a mări specificitatea metodei au fost încercate diferite procedee de eliminare a substanțelor enumerate, dar fără rezultate. Singurul criteriu de diferențiere rămânând viteza de apariție a culorii picratului alcalin de creatinină față de viteza apariției reacțiilor nespecifice.

#### 1. Metoda de defecare

**Reactivi:** — Soluție saturată de acid picric:

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| acid picric .....                     | 1,2 g  |
| apă distilată .....                   | 100 ml |
| — Sol. hidroxid de sodiu 10 g%        |        |
| — Sol. tungstat de sodiu 10 g%        |        |
| — Sol. acid sulfuric 2/3 N            |        |
| — Sol. acid clorhidric 1 N            |        |
| — Sol. etalon creatinină 1 g% ml apă. |        |

În momentul întrebuițării se diluează soluția etalon după formula:

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Soluție creatinină 1% ..... | 10 ml   |
| Acid clorhidric 1 N .....   | 10 ml   |
| Apă distilată până la ..... | 1000 ml |

Concentrația acestei soluții este de 100 mg %.

**Modul de lucru:** în balon cotate de 25 ml se introduc:

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| ser .....                 | 2,5 ml |
| tungstat de sodiu .....   | 2,5 ml |
| acid sulfuric 2/3 N ..... | 2,5 ml |
| apă distilată .....       | 17,5   |

Se agită și se filtrează.

În alte 2 baloane cotate de aceeași capacitate se introduc:

|               | Probă | Etalon |
|---------------|-------|--------|
| filtrat       | 10    | —      |
| etalon        | —     | 1      |
| acid picric   | 5     | 5      |
| NaOH 10%      | 1     | 1      |
| apă distilată | 9     | 18     |



Se agită: după 5' se citește extincția probei și a etalonului față de apa distilată la  $\lambda = 530 \text{ m}\mu$ , cu cuvă de 1 cm.

Calcul:  $\text{mg } \% \text{ creatinină în ser} = \frac{EP}{EE} \times 10$ .

## 2. Metoda simplificată (standardizare)

**Reactivi:** soluție saturată de acid picric (soluția se face la cald)

— acid picric ..... 1,2 g

— apă distilată ..... 100 ml

— Soluție NaOH 10%

Soluția stoc creatinină 5 mg%

creatinină 5 mg

apă 100 ml

**Modul de lucru:** în eprubete de centrifugă se pipetează:

|                           | Probă   | Martor  |
|---------------------------|---------|---------|
| ser                       | 4 ml    | —       |
| acid picric               | 12 ml   | 5 ml    |
| centrifugare sau filtrare |         |         |
| supernatant               | 5 ml    | —       |
| NaOH 10%                  | 0,25 ml | 0,25 ml |

După 20' citire la  $\lambda = 530 \text{ m}\mu$ , cuvă 1 cm.

Valorile citite se interpolează într-o curbă obținută din diluțiile succesive ale soluției stoc sau se utilizează factorul de pantă (F).

$$F = \frac{C}{E}$$

C = concentrația substanței în mg a probelor etalon

E = extincția probelor etalon.

Valori normale în ser 0,6—1,2 mg %.

## DOZAREA CREATINEI ȘI CREATININEI

**Principiul:** Prin hidroliza cu acidul clorhidric creatina trece în creatinină care se dozează apoi după una din tehnicile cunoscute.

**Reactivi:** — wolframmat de Na 10% în apă distilată

— acid sulfuric 0,7N

— acid clorhidric N

— hidroxid de sodiu N

Reactivii necesari pentru dozarea creatininei sînt aceiași ca la celelalte metode.

**Modul de lucru:**

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| ser, plasmă             | 2 ml  |
| apă distilată           | 14 ml |
| wolframmat de sodiu 10% | 2 ml  |
| acid sulfuric 2/3 N     | 2 ml  |

Se agită bine și se filtrează

La 10 ml filtrat se adaugă 5 ml acid clorhidric N se închide și se lasă 20 minute la 130° în autoclav. După răcire se adaugă:

hidroxid de sodiu N 5 ml  
apă până la 20 ml

Se iau 10 ml pe care se dozează apoi creatinina după tehnica descrisă.

Calcul: se ține seama de diluție.

Din cifra găsită la dozare (care reprezintă suma creatină + creatinină) se scade valoarea creatininei dozată anterior fără dezalbuminizare, iar diferența este înmulțită cu 1,16, obținându-se astfel creatina.

Valori normale: creatină = 0,6—2 mg/100 ml

creatină + creatinină = 3—4 mg/100 ml

$$\text{Indicele creatininei} = \frac{\text{creatină}}{\text{creatină} + \text{creatinină}} = 0,5$$

**Observații:** Concentrația creatininei nu este influențată de regimul alimentar sau de efort fizic. Concentrația crescută a creatininei totale se găsește în afecțiuni renale, în gută și în unele afecțiuni hepatice, în bolile caracterizate printr-o distrugere intensă a proteinelor.

## DOZAREA GLUCOZEI

În studiul metabolismului glucidic metodele de dozare cantitativă a glucozei au un rol determinant.

Descriem metoda de orientare Crecelius și metodele cantitative: titrimetrice (Hagedorn-Jensen) și pe cele colorimetrice (cu ortotoluidină și antronă).

Metoda Hagedorn-Jensen este cea mai veche și cu toate inconvenientele pe care le prezintă prin etapele de lucru numeroase este și astăzi foarte mult aplicată în laboratorul clinic datorită rezultatelor reproductibile pe care le prezintă. Totuși, se observă înlocuirea acestei metode cu cele colorimetrice care sînt simple și se aplică direct pe ser.

Variațiile glicemiei se pot manifesta prin:

- hipoglicemii și
- hiperglicemii.

### 1. Metoda orientativă (Crecelius)

**Principiu:** substanțele reducătoare dau cu acidul picric în mediu alcalin, acidul picramic care este de culoare roșu-cărmăziu.

**Reactivi:** — Soluție saturată de acid picric 1,2%

— Hidroxid de sodiu 20%

**Modul de lucru:** în 2 eprubete se pipetează:

|                           | Probă  | Martor |
|---------------------------|--------|--------|
| apă distilată             | 1,8 ml | 2 ml   |
| sînge total               | 0,2 ml | —      |
| acid picric               | 1 ml   | 1 ml   |
| Agitare, repaus, filtrare |        |        |
| supernatant               | 1 ml   | 1 ml   |
| NaOH 20%                  | 0,1 ml | 0,1 ml |

5' fierbere, răcire



Citirea se face la aparatul Crecelius.

Valori normale 90—140 mg%.

## 2. Metoda Hagedorn-Jensen

**Principiu:** glucoza din sînge în mediu alcalin la fierbere reduce fericianura de K în ferocianură, care în prezența sulfatului de zinc precipită sub formă de sare dublă de zinc și potasiu. Excesul de fericianură se titrează iometric.

### Reactivi:

1 — NaOH N/10

2 — Soluție stoc sulfat de zinc .....45 g%  
— se diluează 1/100 în momentul întrebuițării.

3 — Soluție fericianură K N/200

fericianură de potasiu .....1,65 g

carbonat de sodiu anhidru .....10,6 g

apă distilată .....1000 ml

4 — Soluție sulfat de zinc — clorură de sodiu

sulfat de zinc ..... 50 g

NaCl ..... 250 g

apă distilată .....1000 ml

5 — Soluție iodură de potasiu — sulfat de zinc — clorură de sodiu  
— în momentul întrebuițării se amestecă:

2,5 g KI în 100 ml sulfat de zinc — clorură Na

6 — Acid acetic 3%

7 — Soluție amidon 1%

8 — Soluție tiosulfat de sodiu N/200 — (se prepară în momentul întrebuițării)

### Modul de lucru:

— **Deproteinizare:** în 2 eprubete se pipetează:

|                         | Probă  | Martor  |
|-------------------------|--------|---------|
| soluție NaOH N/10       | 1 ml   | 1 ml    |
| soluție sulfat Zn 0,45% | 5 ml   | 5 ml    |
| sînge                   | 0,1 ml | —       |
| apă distilată           | —      | 0,1 ml. |

Cu ajutorul unui stativ metalic, eprubetele se fierb 3 minute pe baie de apă. Se filtrează cantitativ conținutul fiecărei eprubete în eprubete Hagedorn (20/20) prevăzute cu pilnii de sticlă în care se găsesc filtre de hîrtie, spălate în prealabil de cîteva ori cu apă distilată fierbinte pentru îndepărtarea substanțelor reducătoare existente. După deproteinizare, filtratului obținut i se adaugă:

|                                     | Probă      | Martor     |
|-------------------------------------|------------|------------|
| Fericianură de potasiu              | 2 ml       | 2 ml       |
| Se fierbe pe baie de apă 15 minute. |            |            |
| Se răcește la curent de apă.        |            |            |
| reactiv iodură de potasiu           |            |            |
| sulfat de zinc                      | 3 ml       | 3 ml       |
| NaCl                                |            |            |
| acid acetic 3%                      | 2 ml       | 2 ml       |
| soluție amidon 1%                   | 4 picături | 4 picături |

Titrarea se efectuează cu tiosulfat de sodiu N/200 pînă la dispariția culorii albastre.

### Calcul

Se caută în tabelul LXXXV cantitatea de glucoză corespunzătoare mililitrilor de tiosulfat N/200 întrebuințați la titrarea matorului și a probei. Diferența obținută exprimă cantitatea de glucoză la 100 ml singe de cercetat.

Tabelul LXXXV

Tabel pentru microdozări glucoză Hagedorn-Jensen (ml tiosulfat N/200 = mg glucoză%)

| ml tiosulfat<br>N/200 | 0   | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| —                     | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| 0,0                   | 385 | 382 | 379 | 376 | 373 | 370 | 367 | 364 | 361 | 358 |
| 0,1                   | 355 | 352 | 350 | 348 | 345 | 343 | 341 | 338 | 336 | 335 |
| 0,2                   | 331 | 329 | 327 | 325 | 323 | 321 | 318 | 316 | 314 | 312 |
| 0,3                   | 310 | 308 | 306 | 304 | 302 | 300 | 298 | 296 | 294 | 292 |
| 0,4                   | 290 | 288 | 286 | 284 | 282 | 280 | 278 | 276 | 274 | 272 |
| 0,5                   | 270 | 268 | 266 | 264 | 262 | 260 | 259 | 257 | 255 | 253 |
| 0,6                   | 251 | 249 | 247 | 245 | 243 | 241 | 240 | 238 | 239 | 234 |
| 0,7                   | 232 | 230 | 228 | 226 | 224 | 222 | 221 | 219 | 217 | 215 |
| 0,8                   | 213 | 211 | 209 | 208 | 206 | 204 | 202 | 200 | 199 | 197 |
| 0,9                   | 195 | 193 | 191 | 190 | 188 | 186 | 184 | 182 | 181 | 179 |
| 1,0                   | 177 | 175 | 173 | 172 | 170 | 168 | 166 | 164 | 163 | 161 |
| 1,1                   | 159 | 157 | 155 | 154 | 152 | 150 | 148 | 146 | 145 | 143 |
| 1,2                   | 141 | 139 | 138 | 136 | 134 | 132 | 131 | 129 | 127 | 125 |
| 1,3                   | 124 | 122 | 120 | 119 | 117 | 115 | 113 | 111 | 110 | 108 |
| 1,4                   | 106 | 104 | 102 | 101 | 099 | 097 | 095 | 093 | 092 | 090 |
| 1,5                   | 088 | 086 | 084 | 083 | 081 | 079 | 077 | 075 | 074 | 072 |
| 1,6                   | 070 | 068 | 066 | 065 | 063 | 061 | 059 | 057 | 056 | 054 |
| 1,7                   | 052 | 050 | 048 | 047 | 045 | 043 | 041 | 039 | 038 | 036 |
| 1,8                   | 034 | 032 | 031 | 029 | 027 | 026 | 024 | 022 | 020 | 019 |
| 1,9                   | 017 | 015 | 014 | 012 | 010 | 008 | 007 | 005 | 003 | 002 |

### Exemplu:

mator alb = 1,85 ml tiosulfat de sodiu N/200 (0,005 N)

probă = 1,26 ml tiosulfat de sodiu 0,005 N

mg glucoză % ml singe = 131—26 = 105.

Valori normale: mg glucoză % ml singe = 70 — 120.

### 3. Metoda cu orto-toluidină (reactiv cromogen)

**Principiu:** Grupările aldo și ceto ale hexozelor dau cu aminele aromatice compusi colorați. Pentru glucozamină cea mai indicată este orto-toluidina.

#### Reactivi:

— acid tricloracetic soluție 10%

— reactiv orto-toluidină

orto-toluidină .....60 ml

acid acetic 50% până la .....1000 ml

tiouree .....1,5 g

atunci cind reactivul este foarte intens colorat orto-toluidina trebuie redistilată.

— Standard glucoză 1‰

glucoza .....100 mg

soluție saturată de acid benzoic.....100 ml



**Modul de lucru:** în trei eprubete se pipetează:

|                          | Probă  | Standard | Blanc  |
|--------------------------|--------|----------|--------|
| sînge (ser, plasmă, LCR) | 0,2 ml | —        | —      |
| standard                 | —      | 0,2 ml   | —      |
| acid tricloracetic 10%   | 2 ml   | 2 ml     | 0,5 ml |

Se amestecă și după 5 minute se centrifughează

|                      |        |        |        |
|----------------------|--------|--------|--------|
| supernatant sînge    | 0,5 ml | —      | —      |
| supernatant standard | —      | 0,5 ml | —      |
| orto-toluidină       | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml |

Se amestecă și se ține 20 minute la fierbere în baie. Se răcește cu gheață și apoi se citește extincția probelor EP și a standardului ES față de blanc la  $\lambda = 660 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm.

Calcul:  $\text{mg glucoză}/100 \text{ ml sînge} = \text{EP}/\text{ES} \times 100$

Metoda se poate aplica și fără deproteinizare atunci cînd serul sau plasma sînt clare și lipsite de orice fel de hemoliză.

|                | Probă  | Standard | Blanc  |
|----------------|--------|----------|--------|
| ser            | 0,1 ml | —        | —      |
| apă distilată  | —      | —        | 0,1 ml |
| standard       | —      | 0,1 ml   | —      |
| orto-toluidină | 3,0 ml | 3,0 ml   | 3,0 ml |

Se fierbe 10 minute, se răcește cu gheață. Citirea la  $\lambda = 660 \text{ m}\mu$ , cuva 1 cm față de martor.

#### 4. Metoda cu antrona

**Principiu:** glucoza dă cu antrona un complex colorat a cărui intensitate de culoare e proporțională cu concentrația de glucoză.

**Reactivi:**

- Acid tricloracetic 10%
- Reactiv antrona-tiouree în acid sulfuric 66%
- Acid sulfuric 66% — În balon de 1000 ml se pun:  
apă distilată.....340 ml  
acid sulfuric concentrat 600 ml

În alt balon cotelat de 1000 ml se pipetează:

acid sulfuric 66% .....300 ml și se adaugă  
antrona.....500 ml  
tiouree ..... 10 g

Amestecul se încălzește la  $80^\circ$  pentru dizolvare. Se aduce apoi la semn cu acid sulfuric 66%.

- Soluție etalon de glucoză 2%<sub>oc</sub>.

**Modul de lucru:** în 2 eprubete se pipetează:

|                        | Probă | Martor |
|------------------------|-------|--------|
| sînge                  | 1 ml  | —      |
| acid tricloracetic 10% | 9 ml  | —      |
| Filtrare               |       |        |
| filtrat                | 1 ml  | —      |
| apă                    | —     | 1 ml   |
| reactiv antronă        | 10 ml | 10 ml  |

Proba și martorul se fierb 15 minute la întuneric apoi se răcesc la întuneric. Citirea se face la  $\lambda = 620$  m $\mu$ , cuva de 1 cm.

Extincțiile citite sînt interpolate în curba de etalonare făcută din cel puțin 3 diluții ale soluției stoc de glucoză. Diluțiile conțin între 1,80—0,60 g glucoză %<sub>100</sub>. Din aceste diluții se ia 1 ml și se tratează cu reactivul antronă-tiouree ca și proba de analizat.

Valori normale pentru modelele colorimetrice:

mg glucoză % ml ser = 70—120.

#### Observații:

Intensitatea culorii produsă de glucoză și fructoză este aproximativ egală. Galactoză dă numai 54% din culoarea glucozei. Reacția cu pentoze este mult mai puțin sensibilă și are maximum de absorbție la 600 m $\mu$ . Acizii nucleici nu reacționează decît foarte slab și numai la concentrații mari. Acidul ascorbic dă o culoare roșie, triptofanul se colorează în roșu-portocaliu, iar acidul glutamic și gelatina dau o culoare albastră. Acidul levulinic, acetatul, metilgloxalul și polialcoolii nu interferă reacția. Prezența clorurii de sodiu dă extincții mai mari.

Reacția cu antronă este pozitivă, fără hidroliză prealabilă cu polizaharidele compuse din hexoze ca: glicogenul, celuloza, dextrine, dextranul, polizaharidele plantelor, polizaharidele pneumococului tip II și III etc.

#### Interpretări

Valori crescute se întîlnesc în infecții, intoxicații cu oxid de carbon, cafeină, în tumori și accidente cerebrovasculare și în special în diabet.

Tot o creștere se întîlnește și în tumorile glandelor suprarenale.

Valori scăzute se întîlnesc după administrare de doze prea mari de insulină, sau în carcinomul insulelor Langerhans.

#### Proba hiperglicemiei provocate

Se face în cazurile suspecte de diabet, cu glucoza în serul sanguin de 1,20—1,30 g%<sub>100</sub>.

Se recoltează sînge „a jeun” proba I, după care i se dă bolnavului să bea 100 g glucoză dizolvată într-un pahar cu apă.

Următoarele probe II, III, IV sînt recoltate la intervale de 30 minute (foarte exact).

Se dozează glucoza în toate probele. În mod normal proba II va avea valoarea cea mai mare, urmînd ca la probele III și IV valoarea să descrească, proba IV fiind aproximativ egală cu proba I.

În caz de diabet probele III și IV rămîn crescute (în platou) ca și proba II.

## DOZAREA BILIRUBINEI

În ser există bilirubină insolubilă legată de proteine și bilirubină conjugată (glicuronat) solubilă. Prima poartă numele de bilirubină *indirectă*, cea de a doua—bilirubină *directă*.

Bilirubina conjugată formează cu acidul sulfanilic diazotat în mediu neutru, un compus colorat.

Bilirubina legată de proteine ca să formeze cu acidul sulfanilic diazotat același compus colorat trebuie ca în prealabil să fie tratată cu cofeină-benzoat.



Compusul colorat (azopigmentul) are o culoare roșie în mediul acid sau neutru și albastră în mediu alcalin.

Intensitatea complexului colorat este direct proporțională cu cantitatea de bilirubină. În primul caz se determină cantitatea de bilirubină directă; iar în cel de al doilea, cantitatea de bilirubină totală (bilirubină directă + bilirubină indirectă).

### 1. Metoda Jeendrassik

**Reactivi:** — Soluția cofeină-benzoat

|                        |        |
|------------------------|--------|
| cofeină .....          | 20 g   |
| benzoat de sodiu ..... | 30 g   |
| acetat de sodiu .....  | 50 g   |
| apă distilată .....    | 400 ml |

— Soluția NaCl 9g‰

— Reactiv diazo

|                                    |          |
|------------------------------------|----------|
| Soluția A — acid sulfanilic .....  | 2,5 g    |
| — acid clorhidric concentrat ..... | 15 ml    |
| apă distilată .....                | 1 000 ml |
| Soluția B — azotit de sodiu .....  | 0,5 g    |
| apă distilată .....                | 100 ml   |

În momentul întrebuițării se amestecă:

10 ml sol. A + 0,25 ml sol. B.

**Modul de lucru:** în 3 eprubete se pipetează:

|               | bilirubină totală | bilirubină directă | martor  |
|---------------|-------------------|--------------------|---------|
| cofeină       | 1,75 ml           | —                  | 1,75 ml |
| reactiv Diazo | 0,25 ml           | 0,25 ml            | —       |
| soluție NaCl  | —                 | 1,75 ml            | 0,25 ml |

Se agită, se lasă 5 minute la întuneric. Citirea la  $\lambda = 530 \text{ m}\mu$ , față de martor, cuvă 1 cm.

**Calcul:**  $\text{mg bilirubină \% ml ser} = E \times 6,34$

$\text{mg bilirubină indirectă \%} = \text{bilirubină totală} - \text{bilirubină directă}$ .

În caz că nu există bilirubină directă, bilirubina reprezintă bilirubină indirectă.

**Observații:** pentru eliminarea produșilor secundari care interferează la dozarea bilirubinei metoda a fost modificată: se adaugă soluție Fehling II atât în probă cit și la martor. Se formează o bilirubină azoică albastră a cărei extincție se măsoară la  $\lambda = 578 \text{ m}\mu$ .

**Modul de lucru:** în două eprubete se pipetează:

|                 | Bilirubină totală | Martor |
|-----------------|-------------------|--------|
| acid sulfanilic | 0,2 ml            | 0,2 ml |
| azotit de sodiu | 0,1 ml            | —      |
| cafeină         | 1 ml              | 1 ml   |
| ser             | 0,2 ml            | 0,2 ml |

Se agită și se lasă 10 minute la temperatura camerei

|                    |      |      |
|--------------------|------|------|
| soluție Fehling II | 1 ml | 1 ml |
|--------------------|------|------|

Se agită și se lasă 5 minute în repaus. Citirea extincțiilor se face  $\lambda = 578 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm.

**Calcul:**  $\text{mg bilirubină totală \% ml ser} = E \times 105$ .

## 2. Metoda Schellong

*Principiu:* același ca la metoda anterioară

*Reactivi:*

### 1. Acid sulfanilic:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| acid sulfanilic ..... | 1,25 g |
| acid clorhidric ..... | 3,5 ml |
| (d = 1,19)            |        |

Se completează cu apă distilată pînă la 250 ml.

### 2. Azotit de sodiu:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| azotit de sodiu ..... | 175 mg |
| apă distilată .....   | 100 ml |

### 3. Soluție cofeină:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| cofeină .....          | 13,75 g |
| benzoat de sodiu ..... | 18,75 g |
| apă distilată .....    | 200 ml  |

Încălzit pînă la fierbere. După răcire se adaugă apă pînă la 250 ml.

### 4. Tartrat alcalin:

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| tartrat dublu de sodiu și potasiu | 65 g   |
| hidroxid de sodiu .....           | 19 g   |
| apă distilată .....               | 250 ml |

### 5. Clorură de sodiu 0,9%.

Modul de lucru pentru dozarea bilirubinei totale

|                       | Probă   | Martor  |
|-----------------------|---------|---------|
| Acid sulfanilic       | 0,25 ml | 0,25 ml |
| Clorură de sodiu 0,9% | —       | 0,05 ml |
| Nitrit de sodiu       | 0,05 ml | —       |
| Accelerator (cofeină) | 1 ml    | 1 ml    |

Se amestecă și se lasă 10—30' la temperatura camerei

|                 |      |      |
|-----------------|------|------|
| tartrat alcalin | 1 ml | 1 ml |
|-----------------|------|------|

Se amestecă. După 5—30' se măsoară E probei față de Blanc la  $\lambda = 600 \text{ m}\mu$ .

*Calcul:*  $\text{mg bilirubină totală}/100 \text{ ml ser} = E_p \times 8,9$

*Modul de lucru pentru dozarea bilirubinei directe:* în eprubete se pipetează

|                     | Probă   | Martor  |
|---------------------|---------|---------|
| acid sulfanilic     | 0,25 ml | 0,25 ml |
| nitrit de sodiu     | 0,05 ml | —       |
| clorură de sodiu 9% | 2 ml    | 2,05 ml |
| ser                 | 0,5 ml  | 0,5 ml  |

Se amestecă după 5' se citește extincția probei față de blanc la  $\lambda = 530 \text{ m}\mu$ ,  
cuvă de 1 cm.

*Calcul:*  $\text{mg bilirubină directă}/100 \text{ ml ser} = E_p \times 5,9$



### 3. Metoda *jouvençaux* Revol

#### Reactivi:

##### — Diazo A:

acid sulfanilic ..... 1 g  
apă distilată ..... 500 ml  
acid clorhidric concentrat..... 15 ml  
apă distilată pînă la ..... 1 000 ml

##### — Diazo B:

$\text{NaNO}_2$  ..... 1 g  
apă distilată ..... 100 ml

În momentul întrebuintării se diluează 1/2.

Diazo amestec: 0,06 ml Diazo B 0,5% + 2 ml Diazo A.

##### — benzoat de sodiu (BSU):

benzoat de sodiu ..... 25 g  
apă distilată ..... 60 ml  
uree ..... 15 g  
apă distilată pînă la ..... 100 ml

Reactivul se filtrează.

*Modul de lucru:* în 4 eprubete se pipetează:

|               | Martor | Bilirubina directă | Bilirubina totală | Martor |
|---------------|--------|--------------------|-------------------|--------|
| ser           | 0,1 ml | 0,1 ml             | 0,1 ml            | 0,1 ml |
| Diazo A       | 0,2 ml | —                  | —                 | 0,2 ml |
| Diazo reactiv | —      | 0,2 ml             | 0,2 ml            | —      |
| apă           | 1,7 ml | 1,7 ml             | 0,7 ml            | 0,7 ml |
| BSU           | —      | —                  | 1 ml              | 1 ml   |

Citirea se face la  $\lambda = 540 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm.

*Calcul:* mg bilirubină % ml =  $E \times F$

$E$  = extincția.

$F$  = factorul. Pentru calcularea factorului este necesară curba etalon. Această curbă se construiește cu ajutorul a trei diluții obținute din soluția stoc de bilirubină (2 mg%).

Deoarece realizarea unui standard de bilirubină este foarte anevoioasă, se lucrează cu factorul calculat pe baza coeficientului de extincție a azopigmentului la lungimi de undă bine definite. În lipsa unui spectofotometru se poate lucra și cu un fotometru cu filtre (tip Pulfrich). În acest caz:

— pentru bilirubină directă se folosește filtrul S. 53 și se calculează folosind factorul 7,1;

— pentru bilirubina totală se folosește filtrul S.61 și se calculează folosind factorul 10,9.

*Valori normale % ml ser*

bilirubină totală 0,4—1 mg

„ directă 0 — 0,2 mg

„ indirectă 0,2—1 mg

Bilirubina indirectă este crescută în icterul hemolitic, boala Biermer, boala Gilbert, icterul fiziologic la nou-născuți și în unele cazuri de ciroză.

Bilirubina directă este crescută în icterul prin obstrucție, icterul provocat de hepatita virală și în unele cazuri de ciroză.

## DOZAREA COLESTEROLULUI

### 1. Metoda Lieberman-Burchard

**Principiul:** Colesterolul formează cu acidul sulfuric și anhidrida acetică compuși colorați (Reacția Lieberman).

**Reactivi:**

— anhidrida acetică ..... 305 ml

acid acetic glacial ..... 195 ml

După răcire la apă se adaugă

acidul sulfosalicilic ..... 5,5 g

— Acid sulfuric  $d = 1,84$

— Standard — 250 mg colesterol în 100 ml acid acetic glacial.

**Modul de lucru:** în 3 eprubete se pipetează:

|                             | P      | S      | B      |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| ser                         | 0,1 ml | —      | —      |
| standard                    | —      | 0,1 ml | —      |
| reactiv Lieberman           | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,6 ml |
| 5' la temperatura camerei   |        |        |        |
| acid sulfuric               | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| 10' la temperatura camerei. |        |        |        |

Citire față de blanc la  $\lambda = 625 \text{ m}\mu$ , cuva 1 cm.

**Calcul:**  $\text{mg colesterol}/100 \text{ ml ser} = \text{EP/ES} \times 250$ .

### 2. Metoda P.F. Ferro și A.B. Hanu (modificată de Haung)

**Principiul:** se bazează tot pe reacția Lieberman.

**Reactivi:**

1) acid acetic glacial ..... 30 ml

anhidridă acetică ..... 60 ml

acid sulfuric concentrat ..... 10 ml

sulfat de sodiu anhidru ..... 2 g

2) soluție colesterol (standard)

colesterol ..... 0,2 g

acid acetic glacial ..... 100 ml

**Modul de lucru:** în 3 eprubete se pipetează:

|                   | Probă  | Standard | Martor |
|-------------------|--------|----------|--------|
| Reactiv           | 2,5 ml | 2,5 ml   | 2,5 ml |
| Ser               | 0,1 ml | —        | —      |
| Etalon colesterol | —      | 0,1 ml   | —      |
| Apă distilată     | —      | —        | 0,1 ml |

Se agită și se lasă în repaus 20' la temperatura camerei iar citirea se face la  $\lambda 550-650 \text{ m}\mu$ , cuvă 1 cm.

**Calcul:**  $\text{g colesterol la } 1000 \text{ ml ser} = \frac{\text{EP}}{\text{E}_e} \times 2$



### 3. Metoda Rappaport modificată

**Principiu:** se bazează pe reacția Lieberman

**Reactivul** folosit conține:

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| acid acetic .....       | 30 ml |
| anhidridă acetică ..... | 60 ml |
| acid sulfuric.....      | 10 ml |
| sulfat de sodiu .....   | 2 g   |

Reactivul se păstrează la frigider.

Soluția de colesterol:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| — colesterol ..... | 0,25 g |
| — cloroform .....  | 100    |

Observație: reactivul se concentrează în timp.

**Modul de lucru:**

| Modul de lucru | Probă  | Martor | Standard |
|----------------|--------|--------|----------|
| reactiv        | 2,5 ml | 2,6 ml | 2,5 ml   |
| ser            | 0,1 ml | —      | —        |
| apă distilată  | —      | 0,1 ml | —        |
| standard       | —      | —      | 0,1 ml   |

Se agită și se lasă 20' la temperatura camerei.

Citire la  $\lambda$  570 m $\mu$ , cuva 1 cm.

**Calcul:** g colesterol %<sub>0</sub> ml ser =  $E_p \times F = E_p \times 12$

$E_p$  = extincția probei

$F$  = factor = 12, obținut dintr-o curbă realizată cu 5 diluții succesive ale soluției standard de colesterol.

Sau se calculează aplicând formula:

$$g \text{ colesterol } \%_0 \text{ ml ser} = \frac{E_p}{E_s} \times C_s$$

$E_p$  = extincția probei

$E_s$  = extincția standardului

$C_s$  = concentrația standardului.

### 4. Metoda turbidimetrică

**Principiu:** colesterolul total din ser poate fi determinat prin măsurarea turbidității provocată în urma adăugării alcoolatului de sodiu la ser:

**Reactivi:**

— soluție alcoolat de sodiu

|                        |       |
|------------------------|-------|
| — alcool absolut ..... | 45 ml |
| NaOH 30% .....         | 1 ml  |
| apă distilată .....    | 35 ml |

— soluție NaCl 9 g%

— soluție etalon

|                     |        |
|---------------------|--------|
| colesterol .....    | 0,3 g  |
| alcool etilic ..... | 100 ml |

*Modul de lucru:* în două eprubete se pipetează:

|                   | Probă  | Martor probă | Etalon | Martor etalon |
|-------------------|--------|--------------|--------|---------------|
| ser fiziologic    | 1 ml   | 6 ml         | 1 ml   | 6 ml          |
| ser               | 0,2 ml | 0,2 ml       | —      | —             |
| etalon colesterol | —      | —            | 0,2 ml | 0,2 ml        |
| alcoolat de sodiu | 5 ml   | —            | 5 ml   | —             |

Se agită și se lasă în repaus la temperatura laboratorului 10'.

Citirile se fac la  $\lambda = 550$  m $\mu$  a probei față de martor-probă și a etalonului față de martor-etalon.

$$\text{Calcul: } g \text{ colesterol } \%_o \text{ ml ser} = \frac{E_p}{E_e} \times 0,3$$

#### DOZAREA COLESTEROLULUI TOTAL, LIBER ȘI ESTERIFICAT

**Metoda Assous, E.F. și Girard M.L.**

*Principiu:* colesterolul în mediu acid reacționează cu soluția sulfurică de clorură ferică, dînd o culoare roșie-violetă.

*Reactivi:*

— Acid acetic glacial purificat.

Pentru purificare acidul acetic glacial este ținut 24 ore în contact cu acidul cromic. Porțiție: 20 g acid cromic și 100 ml acid acetic glacial; apoi se distilă eliminîndu-se prima și ultima fracțiune.

— Soluție clorură ferică 1% în acid acetic purificat

— amestec acid acetic purificat cu acid sulfuric concentrat volum la volum.

— Etalon colesterol:

colesterol ..... 0,3 g

acid acetic glacial purificat .... 100 ml

*Modul de lucru:* pentru colesterolul total se pipetează în 4 eprubete.

|                                           | Probă   | Martor-probă | Etalon | Martor-etalon |
|-------------------------------------------|---------|--------------|--------|---------------|
| Ser                                       | 0,05 ml | 0,05 ml      | —      | —             |
| Etalon                                    | —       | —            | 0,1 ml | 0,1 ml        |
| Apă bidistilată                           | 0,05 ml | 0,05 ml      | —      | —             |
| Acid acetic concentrat                    | 2,7 ml  | 2,9 ml       | 2,7 ml | 2,9 ml        |
| Soluție FeCl <sub>3</sub>                 | 0,2 ml  | —            | 0,2 ml | —             |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrat | 2 ml    | 2 ml         | 2 ml   | 2 ml          |

Eprubetele sînt lăsate să se răcească. Citirea extincțiilor se face la 30' la  $\lambda = 560-580$  m $\mu$ , cuva de 1 cm.

Pentru colesterolul liber se pipetează în 4 eprubete.

|                                      | Probă  | Martor-probă | Etalon | Martor-etalon |
|--------------------------------------|--------|--------------|--------|---------------|
| ser                                  | 0,1 ml | 0,1 ml       | —      | —             |
| etalon                               | —      | —            | 0,1 ml | 0,1 ml        |
| acid acetic concentrat               | 0,7 ml | 0,9 ml       | 0,7 ml | 0,9 ml        |
| soluție FeCl <sub>3</sub>            | 0,2 ml | —            | 0,2 ml | —             |
| amestec acid acetic și acid sulfuric | 4 ml   | 4 ml         | 4 ml   | 4 ml          |

Se agită și se lasă la 20° în baie timp de 10 minute.



Se agită și se lasă în repaus 30' la temperatura laboratorului. Citirea extincțiilor se face identic ca la determinarea colesterolului total.

$$\text{Calcul: } g \text{ colesterol } \% \text{ ml ser} = \frac{E_p}{E_e} \times 3$$

colesterol esterificat = colesterol total — colesterol liber.

Valorile normale sînt aceleași la toate metodele cu foarte mici deosebiri. Cazul metodei turbidimetrice care prezintă valori mai mici ( $160 \pm 20$  mg% ml ser).

$$\text{mg colesterol total } \% \text{ ser} = 260 \pm 40$$

$$\text{mg colesterol liber } \% \text{ ml ser} = 70 \pm 20$$

$$\text{mg colesterol esterificat } \% \text{ ml ser} = 150 \pm 30$$

$$\frac{\text{Colesterol liber}}{\text{Colesterol total}} = 0,32 \pm 0,05$$

$$\frac{\text{Colesterol esterificat}}{\text{Colesterol total}} = 0,85 \pm 0,05$$

Colesterolul esterificat reprezintă 50—80% din colesterolul total.

Valoarea colesterolului seric la naștere este scăzută, crește în cîteva zile și variază în funcție de vîrste, sex, rasă, alimentație, echilibru neuro-endocrin, profesie.

Valori crescute ale colesterolului seric se întîlnesc în modificări ale metabolismului lipidic ca: ateroscleroză, hiperlipemie esențială, obezitate, diabet, în sindroame nefrotice, în perioada menstruală și graviditate.

Valori scăzute survin în distrofia galbenă a ficatului în afecțiuni ale supra-renalelor, în unele decompensări cardiace, în diferite forme de anemie, inanție și ciroze.

## DETERMINAREA COLESTEROLULUI DIN FRAȚIUNEA BETA-LIPOPROTEICĂ

### 1. Metoda cu heparină

*Principiu:* colesterolul din fracțiunea  $\beta$ -lipoproteică serică este precipitat selectiv de heparina în prezența cationilor bivalenți.

*Reactivi:* Clorură de calciu 0,1 M

clorură de calciu anhidră ..... 11,1 g

apă distilată ..... 1 000 ml

— Clorură de calciu 0,025 M

Extemporaneu se diluează 1 volum din sol. 0,1 M cu 3 volume apă distilată.

— Soluție heparină 1%

*Modul de lucru:* în eprubetă de centrifugă se pipetează:

clorură de calciu 0,025 ..... 10 ml  
ser ..... 1 ml  
heparină ..... 0,2 ml

Se agită și se centrifughează sau se lasă pînă a doua zi. Se decantează supernatantul, iar precipitatul e redizolvat în 2 ml ser fiziologic, care sînt folosiți pentru determinarea colesterolului aplicînd metodele cunoscute.

### 2. Metoda Kunkel 12—6

*Principiu:*  $\beta$ -lipoproteinele sînt precipitate de clorura de sodiu în prezența fenolului.

**Reactivi:** Kunkel

fenol proaspăt distilat ..... 1 g  
clorură de sodiu ..... 12 g (sau 6 g)  
apă distilată 60° ..... 50 ml

agitare pînă la dizolvare  
se completează cu apă pînă la 100 ml. Se filtrează.

**Modul de lucru:** în 2 eprubete de dimensiuni egale cu cele din scara Mac Lagan se pipetează:

|                    | Probă  | Martor |
|--------------------|--------|--------|
| — soluție fenolică | 3,6 ml | —      |
| — ser              | 0,2 ml | 0,2 ml |
| — ser fiziologic   | —      | 3,6 ml |

Se agită, iar după 30' se compară intensitatea floculării cu scara de timol a lui Mac Lagan. Intensitatea reacției se exprimă în unități Mac Lagan.

Serurile normale rămîn clare în prezența reactivilor.

Transformarea unităților Mac Lagan în lipide totale se poate efectua cu ajutorul unui factor arbitrar.

$\text{mg\% lipide totale} = (\text{unități turbidimetrice} \times 16,6 + 267)$

### 3. Metoda cu Lugol

**Principiu:** iodul precipită lipoproteinele anormale

**Reactivi:** soluție concentrată de lugol

iodură de potasiu ..... 10 g  
iod cristalizat ..... 5 g  
apă distilată ..... 100 ml

**Modul de lucru:** pe o lamă o picătură de ser se amestecă cu o picătură reactiv Lugol și o picătură de sulfat de Na 10% pentru decolorare.

După 5' se apreciază rezultatul.

Reacție negativă — amestec limpede

Reacție pozitivă — se produce floculare

Reacție pozitivă: se apreciază cu (+) (++) (+++)

Reacția este pozitivă în: cancer biliar, nefrite cronice evolutive, pneumopatii supurative, tuberculoză, disproteinemie, mileoame.

## DOZAREA LIPIDELOR TOTALE

### 1. Metoda SPV (sulfuric-fosfaric-vanilină)

**Principiu:** lipidele din ser, în mediu acid și în prezența reactivului fosfo-vanilinic dau compuși colorați în roz.

**Reactivi:**

— Acid sulfuric concentrat ( $D = 1,84$ )

— Reactivul fosfo-vanilină

— fosfat monopotasic ..... 6 g  
— vanilină ..... 0,3 g  
apă distilată ..... 100 ml



**Modul de lucru:** în 2 eprubete se pipetează:

|                          | Probă  | Martor |
|--------------------------|--------|--------|
| acid sulfuric concentrat | 1 ml   | 1 ml   |
| ser diluat 1/20          | 0,1 ml | —      |
| fierbere 20' în apă      |        |        |
| reactiv fosfo vanilină   | 2      | 2      |

Agitare. Repaus 10'. Centrifugare 5' la 3000 t/'. Citirea probei se face față de martor la  $\lambda = 530$  m $\mu$  cuva 1 cm.

## 2. Metoda turbidimetrică

**Principiu:** lipidele din serul deproteinizat cu alcool izopropilic dau cu acidul tricloracetic o opalescență a cărei intensitate este proporțională cu concentrația lipidelor din ser.

**Reactivi:** — alcool izopropilic

— acid tricloracetic 10%

— standard trioleină 5 mg/ml în alcool izopropilic

**Modul de lucru:** în 3 eprubete se pipetează:

|                    | Probă  | Martor | Standard |
|--------------------|--------|--------|----------|
| ser                | 0,1 ml | —      | —        |
| trioleină          | —      | —      | 0,1 ml   |
| alcool izopropilic | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml     |

Agitare 2'—10'. Repaus. Centrifugare 5' la 3 000 t'.

|                    | Probă  | Martor | Standard |
|--------------------|--------|--------|----------|
| supernatant        | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml   |
| acid tricloracetic | 3 ml   | 3 ml   | 3 ml     |

Se agită, se lasă 60' în repaus iar citirile se fac la  $\lambda = 450$  m $\mu$ , cuva 1 cm față de martor.

$$\text{Calcul: } \text{mg lipide \% ml ser} = \frac{EP}{ES} \times 500$$

Valori normale: lipide totale/100 ml ser 500—800 mg.

## DETERMINAREA TRIGLICERIDELOR SERICE

### 1. Metoda cu acid cromotropie

**Principiu:** trigliceridele serice sînt extrase selectiv cu amestec alcool-eter de petrol. Glicerina eliberată prin saponificare este oxidată cu acid periodic în aldehydă și acid formic, care în prezența acidului cromotropie dă un complex colorat în roz.

**Reactivi:** Amestec etanol — eter de petrol 1:1 (V:V)

Amestec etanol-eter de petrol 4:1 (V:V)

— Soluție hidroxid de potasiu 2g% în alcool etilic 96°.

În momentul întrebuițării se diluează 1/5 cu alcool 96°.

— Soluție metaperiodat de sodiu

metaperiodat de sodiu ..... 1,06 g

acid sulfuric concentrat ..... 2 ml

apă bidistilată pînă la ..... 100 ml

— Soluție arsenit de sodiu 5 g%.

|                                                        |        |
|--------------------------------------------------------|--------|
| hidroxid de sodiu .....                                | 2,25 g |
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (trioxid de arsen)..... | 5 g    |
| apă bidistilată pînă la .....                          | 100 ml |

— Soluție acid cromotropie

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| a) — acid cromotropie..... | 1 g    |
| apă bidistilată la .....   | 100 ml |
| b) — apă bidistilată ..... | 500 ml |
| — acid sulfuric.....       | 300 ml |

Se amestecă soluția a + b cu grijă la rece. Se completează cu apă distilată la 1 000 ml.

— Soluție etalon trioleină

|                 |        |
|-----------------|--------|
| trioleina ..... | 2 g    |
| cloroform ..... | 100 ml |

În momentul întrebuițării se diluează 0,2 ml la 10 ml cu alcool izopropilic.

*Modul de lucru:* într-o eprubetă cu dop rodat se pipetează:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Amestec alcool-eter petrol 1 : 1 | 2 ml   |
| Ser .....                        | 0,1 ml |

Se fierbe 1' la baie de apă. Se agită, se răcește la temperatura camerei și apoi se adaugă.

|                       |      |
|-----------------------|------|
| eter petrol .....     | 6 ml |
| apă bidistilată ..... | 1 ml |

Se agită. Se lasă în repaus. Rezultă 2 faze: superioară inferioară (se fac 2 extracții, extractele obținute sînt adăugate fazei superioare care conține trigliceridele.

În 3 eprubete gradate se pipetează:

|                               | Probă | Martor | Etalon |
|-------------------------------|-------|--------|--------|
| extract care reprezintă circa | 4 ml  | —      | —      |
| soluție trioleină diluată     | —     | —      | 2 ml   |
| amestec etanol-eter 4 : 1     | 1 ml  | 1 ml   | 1 ml   |
| apă bidistilată               | —     | 4 ml   | 2 ml   |

Se agită, iar apoi eprubetele sînt lăsate în repaus rezultînd cele 2 faze:

faza inferioară care este îndepărtată prin pipetare și faza superioară care va fi tratată de 2 ori cu amestec etanol-eter în aceleași condiții ca prima oară.

Extractele sînt evaporate

Peste reziduu uscat, format din trigliceride se adaugă

|                      | Probă  | Martor | Etalon |
|----------------------|--------|--------|--------|
| soluție de lucru KOH | 0,5 ml | —      | 0,5 ml |
| alcool               | —      | 0,5 ml | —      |

Agitare pînă se solvă reziduu 15' în baie la 60—70°.

Răcire

|                       |        |        |        |
|-----------------------|--------|--------|--------|
| acid sulfuric .....   | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| apă bidistilată ..... | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |

Agitare 15' în baie la fierbere. Răcire



|            |      |      |      |
|------------|------|------|------|
| eter ..... | 4 ml | 4 ml | 4 ml |
|------------|------|------|------|

Repaus 5'. Se îndepărtează eterul prin aspirație, iar urmele de eter pe baie de apă.

|                     |        |        |        |
|---------------------|--------|--------|--------|
| periodat de potasiu | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
|---------------------|--------|--------|--------|

Se agită și lichidul se colorează în galben.

Dacă culoarea dispare se poate adăuga din nou aceeași cantitate de periodat de potasiu. După 10' de menținere în repaus se adaugă:

|                  | Proba  | Martor | Etalon |
|------------------|--------|--------|--------|
| arsenit de sodiu | 0,1 ml | 0,1 ml | 0,1 ml |
| acid cromotrop   | 5 ml   | 5 ml   | 5 ml   |

Agitare 30' la baie de apă la fierbere. Răcire.

Citire la  $\lambda = 570 \text{ m}\mu$

Calcul:  $\text{mg trigliceride exprimate în trioleină} = \frac{E_p}{E_e} \times 2$

Valori normale — femei 0,4—1,15 g‰  
bărbați 0,5—1,55 g‰.

## 2. Metoda cu reactiv Lloyd

**Principiu:** trigliceridele serice sînt extrase selectiv cu alcool izopropilic și apoi sînt saponificate. Glicerolul eliberat este oxidat în aldehydă formică, care în prezența acetyl-acetonei dă un complex colorat în galben.

**Reactivi:** Amestec de extracție

- oxid de aluminiu  
(trebuie în prealabil uscat la 110°C) 200 g
- sulfat de cupru 5H<sub>2</sub>O ..... 10 g
- hidroxid de calciu ..... 20 g

Reactivul Lloyd (Hartman-Liddon Co) .. 20 g.

Aceste substanțe trebuie mojarate

— Soluție alcoolică de KOH

KOH ..... 0,6 g  
alcool izopropilic ..... 10 ml

\*Se filtrează în momentul întrebuițării.

— Soluție stock de metaperiodat de sodiu

metaperiodat de sodiu ..... 0,05 g  
acid acetic glacial ..... 1,15 ml  
apă bidistilată ..... 10 ml

— Soluție oxidantă (se prepară în ziua întrebuițării)

soluție stock de metaperiodat de  
sodiu ..... 1 ml  
alcool izopropilic ..... 2 ml  
apă bidistilată proaspătă ..... 2 ml

— Soluție acetat de amoniu 15,5%

Se ajustează pH-ul cu acid acetic pînă la un pH =  $6 \pm 0,05$

— Acetyl-acetonă

— Reactivul cromogen

soluție acetat de amoniu ..... 4 ml  
acetyl-acetonă ..... 0,1 ml

Se conservă 1 lună la +4°.

— Soluție etalon de trioleină

trioleină ..... 2 g

alcool izopropilic până la 100 ml.

În momentul întrebuițării se diluează 0,2 ml din sol. până la 10 ml cu alcool izopropilic.

— Alcool izopropilic lipsit de compuși alchidici, altfel trebuie distilat.

*Curba etalon.* Se folosește o soluție de trioleină 20 mg% cloroform sau alcool izopropilic.

În eprubete se adaugă 0,1; 0,2; 0,3... 1 ml soluție etalon, iar în martor 1 ml cloroform sau alcool izopropilic.

Se evaporă și reziduul uscat se lucrează întocmai ca la probe, pornind de la saponificare, adică adăugând în probe 0,5 ml soluție alcoolică cu KOH și în martor 0,5 ml alcool. Dacă este cazul se scade martorul din probe și se trasează curba.

*Modul de lucru:* într-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
|                                | Probă  |
| alcool izopropilic             | 2,8 ml |
| amestec extracție              | 2 g    |
| Se agită și se adaugă          |        |
| ser                            | 0,2 ml |
| Se agită 1 minut și se adaugă: |        |
| alcool izopropilic             | 7 ml.  |

Agitare 1'. Repaus 30'.

Centrifugare 5' la 3000 t. — se lucrează pe supernatant

În 3 eprubete se pipetează:

|                        | Probă  | Etalon | Martor |
|------------------------|--------|--------|--------|
| supernatant            | 2 ml   | —      | —      |
| soluție etalon diluată | —      | 2 ml   | —      |
| alcool izopropilic     | —      | —      | 2 ml   |
| soluție alcoolică KOH  | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |

Agitare 15' la 60°. Răcire

|                  |      |      |      |
|------------------|------|------|------|
| Soluție oxidantă | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
|------------------|------|------|------|

Agitare

Reactiv cromogen 0,5 ml 0,5 ml 0,5 ml

Agitare 30 minute în baie de 50°. Răcire

Se citesc extincțiile la probă și etalon față de martor la  $\lambda=405 \text{ m}\mu$ ; cuvă 1 cm.

*Calcul:*  $\text{g}\%_{\text{oo}}$  trigliceride exprimate în trioleină =  $\frac{E_p}{E_e} \times 2$



### 3. Metoda Tixier-Claude.

Trigliceridele se saponifică eliberind-glicerol. Proteinele, săpunurile, pigmentii se elimină prin absorbție pe hidroxid de magneziu. Glicerolul liber — preexistent — se dozează separat, făcând absorbția inițială — înainte de saponificare — pe hidroxid de magneziu.

Glicerolul se oxidează la formaldehidă, care se dozează cu fenilhidrazină.

#### Reactivi:

— Hidroxid de potasiu, sol. alcoolică 4% (se prepară la întrebuintare).

— Sulfat de magneziu: 3,7 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  în 100 ml apă.

— Acid sulfuric, sol. 2 N

— Meta-periodat de sodiu, sol. 2,5% (se păstrează la rece)

— Fenilhidrazină HCl, sol. 4% (se prepară la întrebuintare)

— Acid clorhidric, sol. 5 N

— Standard: se dizolvă 100 mg tripalmitină în 100 ml cloroform.

#### Saponificare

(P = glicerol total; PG = glicerol liber)

|              | P                              | S      | B      | PG                           |
|--------------|--------------------------------|--------|--------|------------------------------|
| Ser          | 0,1 ml                         | —      | —      | 0,1 ml                       |
| Standard     | —                              | 0,1 ml | —      | —                            |
| KOH          | 0,5 ml                         | 0,5 ml | 0,5 ml | —                            |
| saponificare | 1 oră la 37°C sau 30' la 60°C. |        |        | 1 oră la temp. laboratorului |
| $MgSO_4$     | 1,0 ml                         | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml                       |
| Apă          | 3,0 ml                         | 3,0 ml | 3,1 ml | 3,0 ml                       |
| KOH          | —                              | —      | —      | 0,5 ml                       |

Centrifugare 5 minute la 3 000 rot/min.

#### Oxidarea

|                   | P                      | PG     | S      | B      |
|-------------------|------------------------|--------|--------|--------|
| Supernatant       | 1,0 ml                 | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml |
| Acid sulfuric 2 N | 1,0 ml                 | 1,0 ml | 1,0 ml | 1,0 ml |
| m-periodat Na     | 0,2 ml                 | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml |
|                   | 10 minute la întuneric |        |        |        |

#### Dozare

|                    | P                      | PG     | S      | B      |
|--------------------|------------------------|--------|--------|--------|
| fenilhidrazină     | 0,5 ml                 | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
|                    | 10 minute la întuneric |        |        |        |
| Acid clorhidric 5N | 2,0 ml                 | 2,0 ml | 2,0 ml | 2,0 ml |

După 15—30 minute se măsoară extincțiile P, PG și S contra extincția B.

#### Calcul

$$\frac{E_P - E_{PG}}{E_S} = \text{mg trigliceride/100 ml ser.}$$

Un calcul indirect dar aproximativ pentru trigliceride se poate efectua aplicind formula:

mg trigliceride % ml ser = lipide totale — (2,25 × mg colesterol seric + 90)

Valori normale:

g trigliceride ‰ ml ser = femei = 0,4—1,15

bărbați = 0,5—1,555

Valori crescute se întâlnesc în funcție de alimentație, în timpul sarcinei, hiperlipemia esențială, ateroscleroză, hepatite acute și cronice, hipotiroidie, sindrom nefrotic.

Valori scăzute în infecții cronice, neoplasme, hipertiroidie.

## FOSFOLIPIDE

**Principiu:** precipitatul fosfolipidic obținut prin tratarea serului cu acid tricloracetic este separat prin centrifugare de fosfați anorganici care rămân în soluție. Precipitatul este mineralizat și fosforul lipidic este determinat sub formă de complex molidbdenic.

**Reactivi:** — Acid percloric 70%

— Soluție molidbat de amoniu și acid sulfuric

molibdat ..... 5 g

apă ..... 10 ml.

**Încălzire** 5' la 100°C pînă la solubilizare și după răcire se adaugă: —

acid sulfuric 2 N ..... 50 ml

apă distilată pînă la ..... 100 ml

— Acid sulfuric 2 N

— Soluție de reducere

hidrochinonă ..... 2 g

pirosulfid de sodiu  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  ..... 7 g

apă distilată ..... 100 ml

— Standard fosfor = 4,25 mg P% ml.

$\text{K}_2\text{HPO}_4$  ..... 18,7 g

apă distilată ..... 100 ml.

În momentul întrebuițării se face diluția 1/20.

— acid azotic concentrat 65%

— acid tricloracetic 5%

**Modul de lucru:** proba se lucrează în eprubete de centrifugă iar standardul și martorul în eprubete obișnuite.

|                    | Probă  | Martor | Standard |
|--------------------|--------|--------|----------|
| ser                | 0,1 ml | —      | —        |
| standard           | —      | —      | 0,1 ml   |
| apă distilată      | —      | 0,1 ml | —        |
| acid tricloracetic | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml     |

După 5 minute de centrifugare la 3 000 ture supernatantul se aruncă iar sedimentului i se adaugă:

|                        |            |            |            |
|------------------------|------------|------------|------------|
| acid percloric         | 0,2 ml     | 0,2 ml     | 0,2 ml     |
| acid azotic concentrat | 2 picături | 2 picături | 2 picături |

Se mineralizează în baie de ulei la 180°C, 15 minute:

|                    |        |        |        |
|--------------------|--------|--------|--------|
| apă distilată      | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   |
| molibdat de amoniu | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml |
| hidrochinonă       | 0,2 ml | 0,2 ml | 0,2 ml |

După 10 minute se fotometrează la  $\lambda = 720$ , cuva de 1 cm.

$$\text{Calcul: mg \% fosfor} = \frac{EP}{ES} \times 4,25$$

$$\text{sau mg \% fosfolipide} = \frac{EP}{ES} \times 100$$

Valori normale:

fosfor lipidic: 6—10,5 mg%

fosfolipide : 150—250 mg%



Înmulțind valorile fosforului lipidic cu factorul 25 se obțin mg fosfolipide % ml.

Valori crescute se întâlnesc în ciroze biliare, obstrucții biliare, sindrom nefrotic, hiperlipemie, hipercolesterolemie esențială și diabet zaharat.

## DOZAREA LECITINEI

**Principiu:** același ca la metoda anterioară.

**Reactivi:** — Acid percloric 70%

— Acid molidic

molibdat de amoniu ..... 10 g

apă distilată până la ..... 100 ml

se amestecă pe gheață cu:

acid sulfuric concentrat ..... 100 ml.

— soluție etalon

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ..... 4,4369 g

apă distilată ..... 1 000 ml

Se face o diluție 1/100 în acest caz 5 ml corespund la 1,5 g lecitină.

— Reactiv stanos

stanu ..... 0,1 g

HCl concentrat ..... 2 ml

apă distilată până la ..... 10 ml.

—  $\text{HNO}_3$  concentrat

— Acid tricloraetic 5%

— Soluție fenolftaleină 1%

— NaOH N

**Modul de lucru:** în 3 eprubete de centrifugă se pipetează:

|                   | Probă | Martor | Etalon |
|-------------------|-------|--------|--------|
| ser               | 0,2   | —      | —      |
| acid tricloraetic | 5     | —      | —      |

5' centrifugare la 3 000 t'. Supernatantul înlăturat

|                           |        |        |        |
|---------------------------|--------|--------|--------|
| sediment                  | +      | —      | —      |
| etalon diluat             | —      | —      | 2,5 ml |
| apă distilată             | —      | 2,5 ml | —      |
| acid percloric            | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| $\text{HNO}_3$ (picături) | 3      | 3      | 3      |

15' în baie de ulei încălzită la 180°. Răcire.

Se neutralizează conținutul celor 3 eprubete foarte exact cu NaOH în prezența fenolftaleinei până la viraj roz pal. Se transferă conținutul eprubetelor în baloane de 25 ml și se completează cu apă distilată până la semn, apoi se adaugă:

|                |         |         |         |
|----------------|---------|---------|---------|
| acid molidic   | 1 ml    | 1 ml    | 1 ml    |
| reactiv stanos | 0,25 ml | 0,25 ml | 0,25 ml |

Citire la  $\lambda = 570$  m $\mu$  cuva de 1 cm.

Calcul: g lecitină la 1 000 ml ser =  $\frac{E_p - E_m}{E_E} \times 1,5$

Valori normale: 1,5—2,5 g lecitină %<sub>00</sub> ml ser.

URINA  
SUBSTANȚE ORGANICE

## EXPLORAREA BIOCHIMICĂ A URINII

Recoltarea urinei se face în felul următor:

Într-un vas curat se recoltează prima urină de dimineață pentru examenul sumar de urină (investigații calitative).

Pentru investigații cantitative — glicozurie, albuminurie — se colectează toate emisiunile din 24 ore într-un vas de asemenea curat. Vasul este prevăzut cu un antiseptic (fenol, acid boric, formol, toluol) pentru a împiedica fermentația.

Cantitatea de 0,1 g timol la 100 ml urină nu modifică proprietățile; cantități mari însă, interferează în determinările proteinelor și pigmentilor biliari.

Acidul boric interferează în determinarea glucozei iar formolul în determinarea atât a glucozei cât și a acetonei.

Cloroformul împiedică cercetarea sedimentului și reduce soluția Fehling. Cele mai satisfăcătoare rezultate le dă toluolul aplicat sub forma unui strat subțire care să acopere toată suprafața urinei.

La femei se recomandă toaleta vulvo-vaginală. În cazuri speciale se recomandă cateterismul pentru a nu avea erori în determinarea proteinelor.

*Observații:* de evitat cateterismul pentru a nu provoca infecții vezicale cu germeni de pe uretră mai ales *Proteus*.

Recoltarea se recomandă de asemenea în afara perioadelor menstruale, pentru a evita prezența hematiilor de această proveniență, precum și erori în determinarea proteinelor. Dacă se urmărește un examen bacteriologic al urinei vasul de colectare trebuie să fie steril.

Analiza urinei constă în:

- examen macroscopic
- examen microscopic
- examen chimic.



**Aspectul.** Urina proaspătă în mod normal este clară, transparentă și de culoare galben-roșiatică. Această culoare este datorită conținutului de pigmenți: urocrom, urobilină, urotrină, porfirină și se modifică în funcție de concentrație și de pH.

Urinile acide au culoare închisă iar cele alcaline sînt decolorate.

Pigmenții biliari ca și administrarea unor medicamente (aspirină, piramidon) dau urinei o culoare brună. Culoarea galbenă foarte deschis se întîlnește în insuficiența renală gravă unde rinichiul pierde capacitatea de a transforma cromogenii în pigmenți.

În stări patologice urina poate fi opalescentă, datorită puroiului sau a sărurilor (fosfați, carbonați, urați sau oxalați).

Dispariția opalescenței cu acid acetic 1/10 indică prezența fosfaților sau a carbonaților. Dispariția opalescenței prin încălzirea urinei denotă prezența uraților. Intensificarea opalescenței la încălzire indică prezența proteinelor, carbonaților sau fosfaților.

Dacă opalescența persistă în ambele probe, acestea se datorează puroiului.

Urinile vechi devin tulburi prin contaminare cu bacterii sau prin descompunerea sărurilor alcaline.

În anumite stări patologice, urina conține sînge sau hemoglobină liberă. Aceste urini au o culoare care variază de la roz la roșu brun. Este important să se poată stabili dacă hemoragia provine de la nivelul rinichiului, al ureterelor, al vezicii sau de la nivelul prostatei și uretrei. Pentru aceasta se utilizează așa-numita probă a „celor trei pahare”. Se pune bolnavul să urineze în 3 pahare diferite. În primul pahar se colectează urina de la începutul micțiunii, în cel de al doilea, aceea de la mijlocul ei, iar în cel de al treilea, aceea de la sfîrșit. Se presupune că este vorba de o hemoragie renou-uretrală cînd hematuria este prezentă în toate cele trei pahare (hematurie totală). O hematurie prezentă numai în ultimul pahar (hematurie terminală) permite să se bănuiască o hemoragie de origine vezicală, iar în prezența ei numai în primul pahar (hematurie inițială) o hemoragie de origine prostatică sau uretrală. (Fig. 34). Desigur că pentru precizarea sediului topografic a hemoragiei este de mare folos examenul cistoscopic.

**Mirosul urinei** este ușor aromatic, datorită acizilor volatili sau a unor substanțe numite „urinoide”. Acest miros este caracteristic, mai slab la emisii, dar se dezvoltă în timp. Urinile infectate au miros amoniacal. Mirosul de fructe sau de cloroform apare în acetoză. Un miros neplăcut apare și după ingerarea de usturoi, sparanghel sau hrean.

**Volumul urinei** în 24 ore (tabelul LXXXVI) variază cu cantitatea de li-

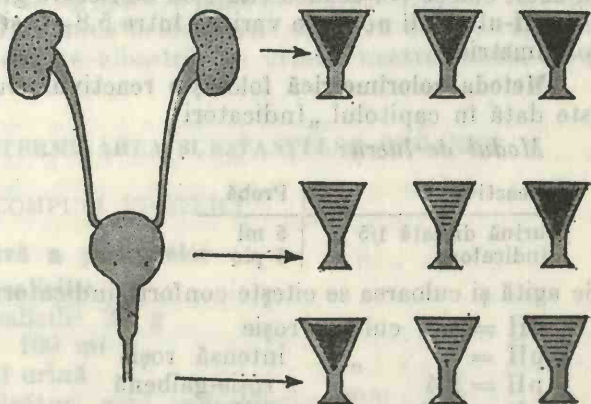


Fig. 34. — Proba celor 3 pahare (după Martinel).

## Variațiile volumului urinii

| Vîrsta      | ml      | Vîrsta         | ml          |
|-------------|---------|----------------|-------------|
| 1—2 zile    | 15—60   | 1 an — 3 ani   | 500—600     |
| 2—10 zile   | 100—300 | 3 ani — 8 ani  | 600—1 000   |
| 10—2 luni   | 250—450 | 9 ani — 15 ani | 800—1 400   |
| 2 luni—1 an | 450—500 | peste 15 ani   | 1 000—1 600 |

chide ingerate precum și cu eliminarea de apă prin transpirație, plămîni, intestin. De asemenea variază în raport cu vîrsta și cu greutatea.

Valori normale: la adult: 1200—1600 ml.

Volumul este crescut în scleroze renale, diabet. Scăzut în diaree, stări febrile, nefroză, nefrite.

## EXAMENUL FIZICO-CHIMIC

Densitatea urinei se determină cu urodensimetrul.

În mod normal este cuprinsă între 1010—1025 și variază în funcție de cantitatea de apă ingerată care se elimină și pe alte căi decît cea renală.

La un volum mare, densitatea scade, iar la un volum mic ea crește. O excepție de la această regulă o constituie diabetul zaharat în care volumul este crescut odată cu densitatea (din cauza eliminării de glucoză și corpi cetonici).

Se pune urina cu grijă ca să nu se facă spumă într-un cilindru suficient de lung și cu diametrul mare pentru ca urodensimetrul să intre ușor. Citirea se face la meniscul inferior. Trebuie avut grije de temperatura la care se face determinarea. În mod normal urodensimetrele sînt calibrate pentru temperatura de 15°. În cazul altor temperaturi se face o corecție. Pentru fiecare 3° în plus se adaugă 0,001, sau se corectează conform tabelului Bouchardat, iar pentru 3° în minus se scad 0,001 (tabelul LXXXVII).

Dacă urina are albumină peste 7 g%, atunci se va modifica și densitatea. În acest caz se vor scădea cîte 0,03 de fiecare gram de proteină în plus.

pH-ul urinei normale variază între 5,8—6 și se determină ionometric sau colorimetric.

Metoda colorimetrică folosește reactivul Guillaumin a cărui compoziție este dată în capitolul „Indicatori“.

Modul de lucru:

| Reactivi          | Probă |
|-------------------|-------|
| urină diluată 1/5 | 5 ml  |
| indicator         | 5 pic |

Se agită și culoarea se citește conform indicatorilor de mai jos:

|          |               |
|----------|---------------|
| pH = 4,6 | culoare roșie |
| pH = 5   | intensă roșie |
| pH = 5,4 | roșie-galbenă |
| pH = 5,8 | galbenă       |
| pH = 6,2 | verde-galben  |



Tabelul Bouchardat

| Temperatura | Urină fără glucoză | Urină cu glucoză |
|-------------|--------------------|------------------|
| 10°         | -0,5               | -0,8             |
| 11°         | -0,4               | -0,7             |
| 12°         | -0,3               | -0,6             |
| 13°         | -0,2               | -0,4             |
| 14°         | -0,1               | -0,2             |
| 16°         | +0,1               | +0,2             |
| 17°         | +0,2               | +0,4             |
| 18°         | +0,3               | +0,6             |
| 19°         | +0,5               | +0,8             |
| 20°         | +0,7               | +1,0             |
| 21°         | +0,9               | +1,2             |
| 22°         | +1,1               | +1,4             |
| 23°         | +1,3               | +1,6             |
| 24°         | +1,5               | +1,9             |
| 25°         | +1,7               | +2,2             |

pH = 6,6 culoare verde

pH = 7 „ verde-albastră

pH = 7,4 „ albastră.

*Metoda cu albastru de bromtimol*

*Reactivi:* 0,04 g albastru de bromtimol în 100 ml etanol 50%.

*Modul de lucru:* se pune 1 ml urină + 2—3 pic. albastru bromtimol.

*Rezultate:* culoarea albastră indică alcalinitate

culoarea galbenă „ aciditate

culoarea verde „ neutralitate

*Metoda cu hirtie de turnesol sau hirtie indicator universal (vezi capitolul „Indicatori“).*

În cazul metodei cu hirtie de turnesol se pune în contact urina de cercetat cu hirtia roșie sau albastră. În urinile acide, hirtia albastră devine roșie. În urinile alcaline, hirtia roșie devine albastră. În urinile neutre, hirtia nu-și modifică culoarea.

## IDENTIFICAREA ȘI DETERMINAREA SUBSTANTELOR ORGANICE

### COMPUȘI PROTEICI

#### A. Determinarea calitativă a proteinelor

##### 1. Metoda cu acid sulfo-salicilic

*Reactivul* — Acid sulfosalicilic 20 g

H<sub>2</sub>O 100 ml

*Modul de lucru:* 3—4 ml urină

8—10 picături acid sulfosalicilic 20%.

*Rezultate:* Apariția unui precipitat indică prezența proteinelor.

## 2. Metoda Heller

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| Reactivi: nitric-nitros: acid nitric | 100 ml |
| H <sub>2</sub> O distilată .....     | 200 ml |
| Nitrit de sodiu .....                | 0,06 g |

*Modul de lucru:* 5 ml urină

2 ml reactiv nitric-nitros.

Reactivul este introdus cu o pipetă efilată în urină la fundul eprubetei, iar la limita de separare a celor două lichide în prezența albuminei apare un inel opalescent.

Pseudoalbuminele dau un inel sau o opalescență deasupra liniei de separare.

Reactivul nitric-nitros poate fi înlocuit cu acid acetic concentrat.

## 3. Metoda cu acid acetic la cald.

Urina centrifugată este trecută într-o eprubetă care se încălzește la partea superioară; partea inferioară rămânând rece.

Apariția unei tulburări poate fi datorată fie precipitării proteinelor fie a fosfaților. Pentru diferențiere se adaugă câteva picături de acid acetic 10% sau acid tricloracetic 10% urinei încălzite. Precipitatul dispare în cazul fosfaților, se menține în cazul proteinelor.

## B. Determinarea cantitativă a proteinelor

### 1. Metoda Esbach

*Principiu:* albuminele sint precipitate de acidul picric în prezența acidului citric.

*Reactivi:*

Reactiv Esbach:

|                     |          |
|---------------------|----------|
| acid picric .....   | 10 g     |
| acid citric .....   | 20 g     |
| apă distilată ..... | 1 000 ml |

*Modul de lucru:*

*Reacția calitativă:* la 2—3 ml urină filtrată se adaugă un volum egal de reactiv Esbach. Apariția unui precipitat care nu dispare la încălzire denotă prezența proteinelor (pseudoalbuminele dispar la încălzire).

*Reacția cantitativă:* în eprubeta gradată a albuminometrului se pune urină limpede pînă la semnul U iar reactiv Esbach pînă la diviziunea R. Se închide, se agită și se lasă în repaus 24 ore în poziție verticală. Se citește apoi nivelul la care a ajuns precipitatul. Concentrația în g‰ de proteină este dată de cifra citită la albuminometru. Dacă cantitatea de albumină este peste 4 g‰ urina se diluează cu apă distilată și se ține seama de diluție la calcul.

### 2. Metoda Heller

*Metoda diluțiilor.* Sensibilitatea metodei Heller este de 0,033 g albumină/litru. Prin diluarea urinei și cercetarea apariției inelului de precipitare metoda devine cantitativă.

*Tehnica:* Se diluează urina care conține proteină cu apă distilată în proporție de 1/5 și se adaugă 2 ml reactiv nitric-nitros ca și la metoda calitativă.



Citirea se face după trei minute. Dacă inelul apare înainte de 3 minute, se va mări diluția. Dacă apare după 3 minute, diluția se va micșora.

Calcul:  $g \text{ proteină } \% = \text{diluția} \times 0,033$

### 3. Metoda cu acid percloric

**Reactivi:** — acid percloric 6,6%

acid percloric 70%..... 5,7 ml

apă ..... 100 ml

— reactiv Biuret soluția stoc:

tartrat dublu de Na și K .. 4,5 g

sulfat de cupru ..... 1,5 g

iodură de K ..... 0,5 g

NaOH 0,2 M până la ..... 100 ml

— diluent pentru soluția stoc:

iodură K ..... 5 g

NaOH 0,2 M ..... 1 000 ml

În momentul întrebuițării reactivul Biuret soluție stoc, se diluează: 1 volum soluție stoc Biuret cu 4 volume diluent.

**Modul de lucru:** într-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

urină ..... 3 ml

acid percloric 6,6% ..... 3 ml

Se centrifughează, se îndepărtează supernatantul iar precipitatul se reia în 3 ml reactiv Biuret de lucru.

După 30 min. se măsoară extincția probei la  $\lambda = 546 \text{ m}\mu$  față de un martor cu reactiv Biuret de lucru.

Calcul:  $g \text{ proteină la } \% \text{ ml urină} = E_p \times 6,5$

### 4. Metoda cu acid sulfosalicilic

**Principiu:** proteinele din urină în prezența acidului sulfosalicilic dau o opalescență a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de proteine.

**Reactivi:**

ser fiziologic

acid sulfosalicilic 20%

**Modul de lucru:** se lucrează pe urină centrifugată.

**Atenție!** În cazul unei urini cu precipitat abundent (după reacția cu acid sulfosalicilic 20%) se diluează urina cu ser fiziologic.

În două eprubete se pipetează:

|                              | Probă  | Martor |
|------------------------------|--------|--------|
| urină centrifugată .....     | 0,5 ml | 0,5 ml |
| acid sulfosalicilic 3% ..... | 2 ml   | —      |
| ser fiziologic .....         | —      | 2 ml   |

După 5 minute se citește la specol  $\lambda = 500 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm. Rezultatele sînt raportate la curba de etalonare sau se folosește factorul  $K = 1,88$  sau 1,90.

### Curba de etalonare:

Soluție stoc: ser uman cu concentrație în proteine cunoscută. În momentul stabilirii curbei se diluează soluția stoc 1/10 și apoi se fac cel puțin 3 diluții succesive cu urină normală ținută la 24 ore la frigider pentru depunerea uraților.

## METODE DE DIFERENȚIERE ÎNTRE PROTEINE ȘI PSEUDOPROTEINE

**Metoda cu acid citric** este analogă determinării de mai sus, utilizându-se reactivul citric în locul celui nitric-nitros.

*Reactiv:* acid citric..... 100 g.  
apă distilată ..... 70 ml.

Pot exista trei posibilități:

— Urina conține proteine și pseudoproteine. În eprubeta cu reactiv citric se observă un inel la limita de separație. În eprubeta cu reactiv nitric-nitros se observă două inele, unul la limita de separație — proteine, iar altul deasupra acestui inel — pseudoproteina.

— Urina nu conține decît proteină. În eprubeta cu reactiv citric nu se observă nici un inel spre deosebire de eprubeta cu reactiv nitric-nitros, care dă inelul de separație a lichidelor.

— Urina conține pseudoproteine. Inelul la limita de separație apare numai în tubul cu reactiv citric.

### **Determinarea proteinei Bence-Jones**

Proteina Bence-Jones este o proteină ce apare în anumite stări patologice (mielom) și are proprietatea de a precipita la 50—60°. Precipitatul dispare total sau parțial cînd temperatura se apropie de punctul de fierbere și reapare la răcire. Această precipitare este dependentă de forța ionică iar pH-ul optim este între 4,6—5,4 fapt pentru care urina trebuie să fie acidulată.

*Reactivi:* tampon acetat pH = 4,9 2 N

*Modul de lucru:* Într-un pahar Berzelius se pipetează:

urină ..... 10—25 ml  
tampon acetat ..... 2,5—5 ml

Se fixează un termometru și se încălzește pe baie de apă. Proteina Bence-Jones este prezentă cînd precipitatul apare la 50—60° și se redizolvă la 100°C. Urinile conținînd proteină trebuie filtrate în apropierea punctului de fierbere și apoi cercetate. Adăugarea citorva picături de clorură de calciu 1% favorizează reacția.

Prezența în urină a unor cantități mari de alte proteine pot masca dizolvarea la fierbere (100°C). Ca testul pentru proteine Bence-Jones să fie pozitiv, trebuie ca urina din 24 ore să conțină peste 600 mg proteine Bence-Jones. Aceste inconveniente fac ca încălzirea la 50—60° să nu prezinte un rezultat precis pentru diagnostic. În cazurile atipice în urmărirea eficienței terapiei aplicate și mai ales în depistarea precoce a recăderilor, rezultate sigure sînt obținute prin testele imunochimice (IEF, DD, IDRS) teste efectuate cu seruri anti Kappa și Lambda. Proteina Bence-Jones apare în urină într-un procentaj mare în cazurile de osteosarcoame, osteomalacie, carcinoame, metastaze ale măduvei leucemie și mielom.

### **Determinarea corpurilor birefringenți**

Corpii birefringenți din urină sînt constituiți din lipide; ei se pun în evidență la microscopul polarizant.

*Tehnica:* se reglează nicolul din ocularul analizator, pentru a obține extincția completă a razelor luminoase. Se pune pe platană o lamă cu o picătură de urină și se acoperă cu o lamelă. Se rotește analizatorul și în cazul prezenței corpurilor birefringenți apare o cruce de Malta viu colorată.



## DOZAREA COMPUȘILOR AZOTAȚI

### AZOTUL TOTAL

#### Metoda Kjeldahl

Metoda este aceeași ca la dozarea în singe cu deosebirea că se folosesc 0,2—0,5 ml urină. Valori normale: 20—30 g în 24 h.

Ureea în urină se determină cu metodele Kowarski și cu urează, descrise la capitolul singe.

a) *Metoda Kowarski*. Urina se diluează de 2 ori la densități sub 1010 și de 4 ori la densități peste 1010.

La calcul se ține seama de diluții.

Ureea crește în procesele de catabolism protidic endogen și în diabet. Scade în insuficiența hepatică (ciroză) sau renală (nefritele acute) și în pielonefrite cronice cu insuficiență a funcției de excreție.

b) *Metoda cu urează*. Urina se diluează 1/1 000 în ser fiziologic. La calcul se ține seama de diluții. Valori normale 20—35 g în 24 ore la adult.

Dozarea ureei în urină nu are semnificație clinică la subiecții normali, deoarece prezintă variații mari în funcție de regimul alimentar.

Este foarte utilă determinarea la bolnavii cu insuficiențe renale acute sau cronice, care permite aprecierea gradului de lezare a parenchimului renal.

### DOZAREA ACIDULUI URIC

#### Metoda Ronchesse

*Principiu*: acidul uric din urină este precipitat sub formă de urat de amoniu cu o soluție amoniacală, fiind apoi titrat iodometric.

#### Reactivi:

#### Soluție Ronchesse:

- amoniac concentrat ..... 150 ml
- clorură de amoniu ..... 15 g
- apă distilată ..... 1 000 ml
- amoniac concentrat
- soluție iod 0,1 N
- soluție amidon solubil 1%
- soluție saturată de borax
- soluție saturată de bicarbonat de Na.

Soluțiile de borax și bicarbonat se amestecă în părți egale.

*Modul de lucru*: determinarea se face pe urină nefiltrată din 24 ore.

La 10 ml urină neutralizată cu 1,5 ml amoniac pentru dizolvarea compușilor urici se adaugă 1,5 g clorură de amoniu. Se agită, se lasă în repaus 30 minute și se filtrează prin hârtie de filtru. Precipitatul de urat este transvazat cu ajutorul unui jet de apă distilată (circa 100 ml) într-un pahar conic. Se adaugă acid acetic până la reacție acidă, operație care transformă uratul în acid uric. Pentru a titra acidul uric se neutralizează cu soluție de borax și bicarbonat. Se adaugă 2 picături de amidon și se titrează cu soluție de iod 0,1 N până la culoarea albastră.

N = numărul de ml din soluția de iod utilizată.

*Calcul*: g acid uric la 1 000 ml urină =  $N \times 0,84$

Valori normale = 0,4 — 0,7 g acid uric la 1 000 ml urină

### Metoda Heilmeyer modificată

**Principiu:** același ca la dozarea acidului uric din ser.

Urina se colectează într-un vas cu 10 ml NaOH 5% pentru a împiedica precipitarea uraților. Pentru lucru urina se diluează 1/100.

#### Reactivi:

— reactiv fosfowolframic — identic ca la dozarea acidului uric din ser.

— tampon pH = 12,5:

|                |        |
|----------------|--------|
| glicocol ..... | 3 g    |
| NaOH .....     | 4 g    |
| apă .....      | 100 ml |

— standard acid uric 5 mg% ml

#### Modul de lucru:

|                                | Probă  | Standard | Blanc  |
|--------------------------------|--------|----------|--------|
| urina diluată                  | 2,5 ml | —        | —      |
| standard                       | —      | 2,5 ml   | —      |
| apă                            | —      | —        | 2,5 ml |
| tampon                         | 0,5 ml | 0,5 ml   | 0,5 ml |
| Se amestecă și se lasă 1 minut |        |          |        |
| reactiv fosfowolframic         | 0,1 ml | 0,1 ml   | 0,1 ml |

Se amestecă energic și se lasă 30 minute.

După 30 minute se măsoară extincția probelor (EP) și a standardului (ES) față de blanc la  $\lambda = 710 \text{ m}\mu$  (filtru  $S_{72}$ ), cuva de 1 cm.

#### Calcul:

$$\frac{EP}{ES} \times 0,05 = \text{g acid uric/litru urină}$$

### CERCETAREA AMONIACULUI

Amoniacul este pus în libertate prin adăugarea de carbonat Na și apoi prin distilare la 50°. Este prins de HCl, iar cantitatea de acid rămasă se determină prin titrarea cu o bază.

#### Reactivi:

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| Fenolftaleină (indicator) .....    | 1 g    |
| alcool 96° .....                   | 100 ml |
| NaOH .....                         | 0,02 N |
| HCl .....                          | 0,02 N |
| carbonat de sodiu soluție saturată |        |
| roșu de metil .....                | 0,1 g  |
| alcool 96° .....                   | 100 ml |

**Modul de lucru:** distilarea se face în aparatul reprezentat în fig. 35. Vasul B conține apă distilată acidulată cu 2—3 picături acid clorhidric N pentru a reține urmele de amoniac din atmosferă.

#### Vasul A conține:

|                      |              |
|----------------------|--------------|
| urină .....          | 10 ml        |
| carbonat de Na ..... | 5 ml         |
| fenolftaleină .....  | 2—3 picături |

apoi este așezat în vasul D cu apă la 40—50°.



Vasul C conține:

HCl 0,02 N ..... 10 ml

roșu metil ..... 2—3 picături

Vasele sînt legate între ele cu un tub de cauciuc. Din momentul în care s-au adăugat 5 ml soluție de carbonat de sodiu peste 10 ml urină se închide

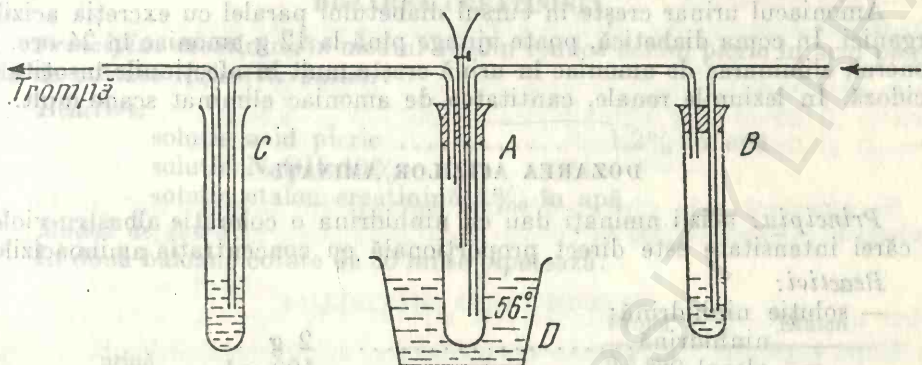


Fig. 35. — Aparat pentru distilarea amoniacului.

A — tubul cu proba; B — tub spălător aer; C — tub colector; D — vas cu apă la 40—50°C.

perfect aparatul și se dă drumul la trompa de apă. După 20 minute se oprește distilarea. Vasul C care a captat amoniacul din urină se detașează de aparat și se titrează cu hidrat de sodiu N/50.

Calcul: 1 ml HCl 0,02 N = 0,34 mg  $\text{NH}_3$

mg  $\text{NH}_3\%$  ml urină =  $(10-n) \times 3,4$

n = ml NaOH 0,02 N folosiți la titrare

Valori normale:

0,6—0,8 g  $\text{NH}_3$  în urina de 24 ore.

#### DOZAREA AMONIACULUI ȘI A AMINOACIZILOR

##### Metoda cu formol (Sørensen-Ronchesse)

Urina tratată cu o soluție neutră de formol devine acidă față de fenolftaleină.

Acizii aminați în prezența formolului își pierd caracterul baze, rămînînd cu funcția carboxil, care se poate titra cu NaOH.

Reactivi: NaOH ..... N/10

formol diluat v/v cu apă distilată.

neutralizat cu NaOH N/10 în prezența fenolftaleinei

Fenolftaleină 1% în alcool 96°.

Modul de lucru: se pipetează în 2 baloane de 150—200 ml

|                                                  | Probă  | Marior |
|--------------------------------------------------|--------|--------|
| urină                                            | 10 ml  | —      |
| apă                                              | 100 ml | 110 ml |
| NaOH, 0,1 N pînă la apariția unei culori roz pal |        |        |
| formol                                           | 20 ml  | 20 ml  |

Amestecul prin adăugare de formol se decolorează punînd în libertate acizii care au fost combinați cu amoniacul.

Se titrează cu NaOH 0,1 N pînă la culoarea roz-pal.

*Calcul:* 1 ml NaOH 0,1 N = 1,75 mg NH<sub>3</sub>  
 gNH<sub>3</sub>%<sub>00</sub> ml urină = n × 0,175  
 n = cantitatea NaOH 0,1 N întrebuințată la titrare.

Cantitate de amoniac în 24 h:

0,5–1,2 g NH<sub>3</sub>

Amoniacul urinar crește în cursul diabetului paralel cu excreția acizilor organici. În coma diabetică, poate ajunge pînă la 12 g amoniac în 24 ore. În general, eliminarea de amoniac în urină crește mult în afecțiunile însoțite de acidoză. În leziunile renale, cantitatea de amoniac eliminat scade mult.

## DOZAREA ACIZILOR AMINATE

*Principiu:* acizii aminați dau cu ninhidrina o colorație albastru-violet, a cărei intensitate este direct proporțională cu concentrația aminoacizilor.

*Reactivi:*

— soluție ninhidrină:

ninhidrină..... 2 g  
 alcool 96° ..... 100 ml

— soluție etalon stoc glicocol:

glicocol ..... 267 mg  
 benzoat de sodiu ..... 1 g  
 acid clorhidric 0,07 N ..... 500 ml

Soluție etalon stoc acid glutamic:

acid glutamic ..... 525 mg  
 Benzoat Na ..... 1 g  
 HCl ..... 0,07 N..... 500 ml

Soluția etalon de lucru se obține amestecînd v/v cele două soluții stoc. Din acest amestec 10 ml sînt neutralizați cu (0,7 ml) NaOH N. Apoi se diluează 1/20 cu alcool de 96° 1 ml soluție etalon conțin 5 mg azot aminic.

*Modul de lucru*

În 3 eprubete de centrifugă se pipetează:

|                                    | Proba  | Etalon | Martor |
|------------------------------------|--------|--------|--------|
| urină 1/6                          | 1 ml   | —      | —      |
| alcool 96°                         | 10 ml  | —      | —      |
| centrifugare 10' — 2 500 ture/min. |        |        |        |
| supernatant                        | 1,5 ml | —      | —      |
| etalon                             | —      | 1 ml   | —      |
| alcool 96°                         | —      | 0,5    | 1,5    |
| soluție ninhidrină                 | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml |

1 minut la baie de 70°, răcire, citire la  $\lambda = 530$  m $\mu$  cuvă 1 cm.

*Calcul:*

$$\text{mg azot amoniacal } \%_0 \text{ urină} = \frac{E_p}{E_e} \times 5 \times 84$$

Valori normale: copii 50–200 mg%<sub>00</sub> ml urină

adulți 500 mg azot aminat în urina din 24 ore.



Valori crescute în sindromul lui De Toni Debré Fanconi, maladia Wilson maladia Harnup. Administrarea de cortizon, ACTH și tetracelină dau valori crescute.

Alte metode pentru dozarea azotului aminic vezi „Addendum“.

#### DOZAREA CREATININEI

**Principiu:** creatinina în mediul alcalin reduce acidul picric în acid picramic de culoare roșie (R. Jaffe).

**Reactivi:**

soluție acid picric ..... 1,2% în apă

soluție NaOH 10%

soluție etalon creatinină 1‰ în apă

**Modul de lucru:**

În două baloane cotate de 50 ml se pipetează:

|                   | Proba  | Etalon |
|-------------------|--------|--------|
| urină             | 0,5 ml | —      |
| etalon creatinină | —      | 0,5 ml |
| acid picric       | 15 ml  | 15 ml  |
| hidroxid de Na    | 1,5 ml | 1,5 ml |

apă distilată pînă la semn.

Se lasă în repaus 10 minute. Se agită și se procedează ca la dozarea creatininei în sine.

**Calcul:**  $\text{g‰ creatinină în urină} = \frac{E_p}{E_e} \times 1$

Valori normale:

bărbați: 1 g‰

femei: 0,5 g‰

Se poate luera reducînd 1/5 urina și reactivi.

#### DOZAREA CREATININEI TOTALE

**Reactivi:** 1. Soluția acid picric 1,2 g% în apă distilată

2. HCl N.

**Tehnica:** Într-un vas Erlenmeyer se pipetează 10 ml urină și 5 ml HCl N/1 se încălzește 3 ore pe o baie de apă. Se filtrează într-un balon cotat de 25 ml. Se aduce cu apă la semn iar din această soluție se pipetează 1 ml într-un balon cotat de 100 ml. Se procedează în continuare ca în cazul dozării creatininei.

#### INDICANUL

**Reacția Jaffe**

**Principiu:** indicanul dă o culoare albastră în prezența acidului clorhidric fiind oxidat de clorura de calciu, apa oxigenată sau permanganat în indigo albastru.

**Reactivi:**

- cloroform
- soluție clorură de calciu 5%
- acid clorhidric concentrat ( $D = 1,19$ )
- soluție permanganat de potasiu 2%
- apă oxigenată ..... 20%

**Modul de lucru:** Într-un balon Erlenmeyer se pipetează:

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| HCl .....               | 5 ml   |
| cloroform .....         | 4 ml   |
| apă oxigenată .....     | 0,1 ml |
| permanganat .....       | 0,1 ml |
| clorură de calciu ..... | 0,1 ml |

Se amestecă prin răsturnare, fără agitare. În prezența indicianului se produce o colorație violet în stratul apos și albastru în stratul cloroformic.

**DETERMINAREA GLUCIDELOR**

După ingerarea de anumite medicamente, urina poate prezenta o oarecare putere reductoare prin formare de compuși glicuronicici.

Albumina, pigmentii biliari, creatinina, acidul uric în cantități mari dau false reacții.

Pentru a se înlătura aceste inconveniente, urina trebuie defecată, operație realizată cu ajutorul reactivului Courtonne și a reactivului Patein.

**Reactivul Courtonne:**

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| acetat bazic de plumb ..... | 300 g    |
| apă .....                   | 1 000 ml |

Se dizolvă acetatul de plumb în apă și se adaugă acid acetic până la neutralizare (față de hirtie indicator).

**Mod de lucru:** Se pipetează într-un balon:

|                    |
|--------------------|
| 100 ml urină       |
| 10 ml R. Courtonne |

Se agită și se filtrează. Filtratul trebuie să fie limpede.

Pe urina deproteinizată se poate determina glucoza.

**Reactiv Patein**

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| 1. Oxid roșu de mercur.....  | 200 g  |
| Acid azotic $D = 1,40$ ..... | 160 ml |
| Apă .....                    | 150 ml |
| NaOH 30%.....                | 10 ml. |

Oxidul roșu de mercur este dizolvat parțial în acid azotic. Pentru dizolvare completă se adaugă apă distilată și se încălzește la fierbere. După răcire se adaugă 10 ml NaOH 30%, se agită tot timpul și se aduce la 1 000 ml cu apă distilată.

2. NaOH 10%
3. acid acetic 10%
4. zinc pulbere.

**Defecarea urinei**

**Modul de lucru:** se amestecă într-un pahar:

- 50 ml urină
- 25 ml reactiv Patein



Se agită și se adaugă:

20 ml NaOH 10% până la neutralizare (față de hirtie indicator).

Se aduce la 100 ml cu apă distilată.

Se filtrează, filtratul reprezintă urină diluată 1/2.

Pentru îndepărtarea mercurului se tratează cu 1 g pulbere de zinc. Se agită 3—4 ore.

Se filtrează din nou și se adaugă NaOH 10% până la reacție alcalină (față de hirtie indicator).

Urinile bogate în albumină, împiedică dozarea glucozei. Se adaugă câteva picături de acid acetic 10% sau tompon acetat pH4,5 și se fierbe 30 secunde. Supernatantul obținut din centrifugare sau filtrare este folosit la determinări cantitative și calitative.

#### A. Determinarea calitativă a glucidelor

În mod curent această determinare se efectuează prin urină nedefecată, în cazuri patologice urina se defecă.

##### 1. Metoda Fehling

**Principiu:** glucoza prin funcția ei aldehidică în mediul alcalin reduce hidroxidul de cupru la suboxid de cupru (oxid cupros) de culoare roșie-cărămizie.

**Reactivi:** Fehling I:

— sulfat de cupru cristalizat ..... 35 g

— acid sulfuric concentrat ..... 5 ml

(d = 1,84)

— apă distilată

Fehling II:

— tartrat de sodiu și potasiu ..... 150 g

— NaOH 30% ..... 300 ml

— apă distilată ..... 100 ml

În momentul întrebuițării se amestecă soluția Fehling I + Fehling II în părți egale.

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

2 ml urină

2 ml amestec Fehling I + II

Apoi, eprubeta se trece prin flacără până la fierbere.

**Rezultate:** prezența glucozei dă o culoare roșie-oranj.

Sensibilitatea metodei 4 g glucoză/l.

Streptomicina și negramul eliminate prin urină dau reacții pozitive cu reactivul Fehling.

##### 2. Metoda Nylander

Principiul se bazează pe proprietatea funcției aldehidice a glucozei de a reduce azotatul de bismut în bismut metalic de culoare neagră.

**Reactivul Nylander:**

NaOH ..... 100 g

Sare Seignette (tartrat dublu de

Na și K) ..... 40 g

azotat de bismut ..... 20 g

apă distilată ..... 1 000 ml

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

10 ml urină defecată cu reactiv Patein sau Courtonne

10 ml reactiv Nylander.

Se introduce eprubeta în baie de apă la fierbere 7—10 minute.  
Rezultate: în prezența glucozei, azotatul de bismut este redus în bismut metalic de culoare neagră.

### 3. Metoda Benedict

*Principiul:* același ca în cazul metodei Fehling

Reactivul Benedict:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| a) sulfat de cupru cristalizat | 17,3   |
| H <sub>2</sub> O               | 100 ml |
| b) carbonat de sodiu anhidru   | 100 g  |
| citrat trisodic                | 173 g  |
| H <sub>2</sub> O               | 700 ml |

Soluțiile a și b se amestecă, se dizolvă la flacără și se completează la 1 000 ml cu H<sub>2</sub>O distilată.

*Modul de lucru:* într-o eprubetă se pipetează:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| reactivul Benedict | 5 ml   |
| urină              | 0,5 ml |

Se pun la fierbere 5' în baie de apă. Dacă urina nu conține glucoză, culoarea reactivului nu se modifică.

*Rezultate:* în prezența glucozei: la o concentrație de 0,5—0,6 g glucoză % apare o culoare verzuie; la o concentrație de 1 g% culoarea este galbenă; la o concentrație de peste 2 g% culoarea este roșie.

### B. Determinarea cantitativă a glucidelor

Această determinare se face obligatoriu pe urina defecată.

#### 1. Metoda Ionescu-Matiu

*Principiu:* — Glucoza în mediu alcalin reduce cantitativ fericianura de K la ferocianură; sfârșitul reacției este indicat de acidul picric care este redus la acid picramic de culoare roșie.

*Reactivi:*

— soluție acid picric 1,2%

— soluție etalon glucoză 5‰ (înainte de cântărire glucoza se usucă la 100°C până la greutate constantă)

— reactiv fericianură de potasiu

Soluția A — fericianura de potasiu ..... 46 g  
apă distilată ..... 400 ml

Soluția B — hidroxid de sodiu ..... 46 g  
apă distilată ..... 400 ml

Se amestecă soluțiile A și B, se completează cu apă distilată la 1 000 ml.

*Modul de lucru:* Pentru defecare la 9 ml urină se adaugă 1 ml reactiv Courtonne și se filtrează. Se determină densitatea urinei nedefecate și în funcție de ea se diluează filtratul conform tabelului alăturat.

| Densitate | Diluție |
|-----------|---------|
| 1015—1017 | —       |
| 1020      | 1/2     |
| 1025      | 1/5     |
| 1030      | 1/10    |



După stabilirea densității în 2 baloane Erlenmayer de 100 ml se pipetează:

|                    | Probă       | Etalon      |
|--------------------|-------------|-------------|
| Apă distilată      | 20 ml       | 20 ml       |
| Reactiv fericianic | 10 ml       | 10 ml       |
| Acid picric        | 10 picături | 10 picături |

Baloanele se încălzesc direct la flacără pe sită de azbest și chiar fierbinte, încet se titrează cu urină sau soluție glucoză 5‰ până la virarea amestecului în cărămiziu.

Proba se titrează cu urină = n ml urină.

Etalonul se titrează cu soluție glucoză = N ml soluție glucoză 5‰.

Calcul:

100 ml soluție etalon ..... 0,5 g glucoză  
N ml soluție etalon ..... x g glucoză

$$x \text{ (g glucoză)} = \frac{0,5 N}{100}$$

Dacă N = 10 ml soluție glucoză 5‰, cantitatea de glucoză necesară pentru reducerea reactivului fericianură este 0,05 g.

F (factorul soluției) de titrare este deci 0,05.

$$\text{g glucoză/l urină} = \frac{F \times 1000}{n}$$

n = ml urină întrebuințată la titrare.

## 2. Metoda Benedict

Principiul este același ca în cazul metodei Fehling

Reactivi:

1. Soluție glucoză ..... 1 g%

2. Carbonat de sodiu anhidru sau  
cristalizat

3. Talc

4. Ferrocianură de potasiu ..... 5 g%

5. Reactiv Benedict:

a) carbonat de sodiu anhidru .... 100 g

citrat trisodic sau tripotasic .. 200 g

sulfocianură de potasiu ..... 125 g

apă distilată ..... 800 ml

Se dizolvă la cald; se aduce cu apă distilată la 1 000 ml. Se filtrează.

b) sulfat de cupru 5H<sub>2</sub>O ..... 18 g

apă distilată ..... 100 ml

Se amestecă soluția a cu b.

Se adaugă 5 ml soluție ferrocianură de potasiu, iar după răcire se aduce la 1 000 ml cu apă distilată.

Observații: cântărirea sulfatului de cupru trebuie să fie precisă deoarece este calculat ca 25 ml de reactiv Benedict să fie reduși de 50 ml glucoză, 52 ml levuloză, 54 ml lactoză și 67 ml lactoză.

Modul de lucru: într-un balon Erlenmayer se pipetează:

Reactiv Benedict ..... 25 ml  
Carbonat de sodiu anhidru ..... 6 g sau  
Carbonat de sodiu cristalizat ..... 15 g  
Talc ..... 0,1 g

Se încălzește la fierbere, cînd s-a dizolvat carbonatul de sodiu se adaugă urina de cercetat, cu o pipetă gradată sau cu biureta. Punctul final al titrării este atunci cînd se produce o decolorare totală.

*Calcul:*

$$\text{glucoză g/l} = \frac{F \times 1\,000}{n}$$

F = factorul reactivului = 0,050 g glucoză corespunde la 10 ml glucoză  
n = ml urină folosite la titrare.

**3. Metoda Fehling.** Principiul și reactivii sînt aceiași ca și la metoda calitativă.

*Modul de lucru:*

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| soluția Fehling I .....          | 10 ml |
| soluția Fehling II .....         | 10 ml |
| H <sub>2</sub> O distilată ..... | 20 ml |

Se aduce la fierbere și se titrează cu urina deproteinizată sau cu urina diluată 1/5—1/10.

Urina se adaugă picătură cu picătură dintr-o biuretă sau cu pipeta pînă cînd culoarea soluției trece în galben.

*Calcul:* glucoză g/l urină =  $\frac{F \times 1\,000}{n}$

F = factorul soluției Fehling determinat față de o soluție 1% glucoză  
n = ml urină întrebuințată la titrare pentru reducerea soluției Fehling.

**Metoda cu ortotoluidină**

*Principiu:* același ca la dozarea glucozei în ser.

*Reactivi:* aceiași ca la dozarea glucozei în ser.

*Modul de lucru:*

În trei eprubete se pipetează:

|          | Probă   | Standard | Blanc |
|----------|---------|----------|-------|
| urină    | 0,02 ml | —        | —     |
| standard | —       | 0,02 ml  | —     |
| reactiv  | 2 ml    | 2 ml     | 2 ml  |

Se fierbe 8 minute pe baie de apă. Se răcește cu gheață. Se citesc probele, standardul față de blanc, la  $\lambda = 625-630 \mu\text{m}$ , în cuvă de 1 cm

*Calcul:*

$$\frac{EP}{ES} \times 100 = \text{mg glucoză/100 ml}$$

*Obs.:* Dacă în urină se găsesc cantități mai mari de 750 mg% se diluează urina.

#### 4. Dozarea polarimetrică a glucozei

*Principiu:* glucidele (pentozele și hexozele) datorită prezenței atomilor de carbon asimetrici din moleculă, deviază planul luminii polarizate cu un unghi a cărui mărime este direct proporțională cu concentrația, lungimea tubului polarimetrului și unghiul de deviere specific fiecărei oze.



**Reactivi:** reactivul Courtonne

**Modul de lucru:** Se defecă urina cu reactivul Courtonne

(9 ml urină + 1 ml reactiv Courtonne și se filtrează).

Se umple tubul polarimetrului cu filtrat în așa fel ca în tub să nu rămână bule de aer. Se citește apoi unghiul de deviere la polarimetru.

**Calcul:**  $\alpha = \alpha_D \times 1 \times c$ .

$\alpha$  = unghiul citit la polarimetru

D = unghiul de deviere specific al glucozei (+52,6)

l = lungimea tubului

c = concentrația

g = glucoză existentă în urina filtrată din tub  $= \frac{\alpha}{D \cdot l}$ .

La rezultat se adaugă 1/10 din valoarea obținută, ținându-se astfel cont de diluția efectuată prin defecare.

Rezultatul se raportează la 1 000 ml urină.

#### TESTE PENTRU DIFERENȚIEREA GLUCIDELOR

În urina patologică se pot întâlni diverse glucide ca: glucoza, galactoză, pentoza, fructoza, lactoza etc.

Într-o urină normală, glucidele se găsesc în cantități extrem de mici, încât nu pot fi puse în evidență prin metode calitative.

Este necesar a se face diferențierea tipului de glucid. Cel mai frecvent glucid prezent în urinile patologice este *glucoza*.

Glicozuria poate fi permanentă sau tranzitorie. Acest lucru se constată prin repetate analize ale urinii pe nemâncate și după ingerarea de alimente. O glucozurie tranzitorie poate fi de origine alimentară, în timpul sarcinii, în hipertiroidism și în diferite intoxicații.

O glicozurie permanentă — diabetul — indică alterarea funcției endocrine pancreatice.

Fructoza se găsește în urină de obicei împreună cu glucoza, în diabet sau în urina unor pacienți cu anomalii de metabolism glucidic. În cazul unor leziuni ale parenchimului hepatic, în diferite forme de icter, există o toleranță scăzută pentru fructoză (25–50g), pe când la persoanele sănătoase toleranța este de 100g.

Lactoza poate apărea în urina gravidelor sau în timpul lactației. De asemenea poate apărea la indivizii supuși unui regim lactat.

Pentoza, găsită de obicei în urină patologică, este arabinoza racemică care este reductoare. Ea apare în formele grave ale diabetului zaharat. Există o pentozurie genetică, care nu are nimic comun cu diabetul. Pentoza poate fi găsită în urină și după administrarea unor medicamente (camfor, cloralhidrat etc.) sau după ingerarea unor fructe bogate în pentoze.

**Principiul testelor de diferențiere** este următorul: mono- și dizaharidele se condensează cu fenil-hidrazina, prin gruparea aldehydică sau cetonă dînd produși de condensare numiți osazone.

Testele utilizate sînt:

**Testul pentru glucoză**

**Testul Denigès** pentru diferențierea glucozei de lactoză

**Reactivi:** *Reactivul Denigès*:

acetat de sodiu ..... 4 g

bisulfid de sodiu ..... 0,6 g

apă ..... 40 ml

După dizolvare se adaugă soluției:

acid acetic glacial ..... 8 ml  
fenilhidrazină lichidă ..... 2 ml

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

urină deproteinizată ..... 5 ml  
reactiv Denigès ..... 5 ml

Se ține 45' la baie de apă, se agită și se filtrează la cald.

#### **Rezultate**

Examinarea se face imediat, sau după 6—12 ore la rece.

Osazona glucozei rămasă pe filtru are forma unor ace galbene dispuse în snopi sau radiar, cînd cantitatea depășește 4 g/l.

Cînd cantitatea de glucoză este pînă la un gram cristalele pot apărea și la cald rămînînd pe filtru. Dacă nu apar se centrifughează și sedimentul se examinează la microscop.

#### **Testul pentru fructoză**

Fructoza apare în urină mai rar singură, de obicei împreună cu glucoza astfel că osazona ei este identică cu cea a glucozei.

**Reactivi:** rezorcină 0,1 g în 3 ml

HCl concentrat D = 1,19

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

urină ..... 3 ml  
reactiv rezorcină ..... 1,5 ml

se fierbe 20—30 secunde pe baie de apă.

**Rezultate:** În prezența fructozei apare imediat o culoare roșie. Sensibilitatea metodei de 0,5 g fructoză/litru.

#### **Testul pentru galactoză**

Acest dizaharid poate fi pus în evidență prin transformarea în acid mucic.

Reacția nu este specifică, fiind pozitivă și în prezența lactozei.

**Reactivi:** acid nitric concentrat

**Modul de lucru:** Într-o capsulă se pun:

urină ..... 50 ml  
acid nitric ..... 10 ml

se evaporă pînă la 10 ml.

**Rezultate:** În prezența galactozei lichidul devine clar cu un precipitat alb de acid mucic.

**Testul pentru diferențierea lactozei de galactoză** se referă la diferența de culoare ce se face prin metoda Rubner în cazul prezenței lactozei sau a galactozei.

**Reactivi:** 1. acetat neutru de Plumb .. 10%

2. amoniac 25%

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

urina ..... 10 ml

acetat neutru de plumb 10% 10 picături

Se fierbe și apoi se filtrează. Filtratul se încălzește din nou cîteva minute în care timp apare o culoare galben-maron.

Se adaugă 1 ml amoniac 25% și se continuă fierberea.



**Rezultate:** În prezența lactozei apare un precipitat roșu intens. În prezența galactozei apare un precipitat galben.

#### Testul pentru pentoze

Pentozele apar în urină fie singure fie cu glucoza, îndepărtarea glucozei făcându-se prin fermentare cu drojdie de bere. Pentozele se pun în evidență prin reacția Bial.

**Reactivi:** Reactivul Bial:

orceinol ..... 1 g

HCl 30% ..... 50 ml

clorură ferică 10% ..... 2 picături

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

urină deproteinizată cu reactiv Courtonne ..... 1 ml

reactiv Bial ..... 5 ml

Reactivul Bial se încălzește până la fierbere și se adaugă urina deproteinizată picătură cu picătură.

**Rezultate:** În prezența pentozei apare o colorație verzuie. Fructoza, în aceleași condiții, dă un inel brun.

#### Teste pentru lactoză și maltoză cu reactivul Denigès

Lactoza dă cu fenilhidrazina la rece o lactosazonă caracteristică cu punctul de topire la 213°.

Maltoza dă cu fenilhidrazina la rece o maltozazonă caracteristică în formă de lame aproape rectangulare, unite printr-una din extremități cu punctul de topire = 206°.

#### Proba Wohlk

**Reactivi** — amoniac concentrat

hidroxid de sodiu 22%

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

— urina ..... 5 ml

— amoniac ..... 2 ml

— hidroxid de sodiu ..... 0,2 ml

Eprubeta se introduce în baie de apă la 70—80°. În prezența maltozei sau lactozei apare o culoare roșie după 2—3 minute.

### COMPUȘII CETONICI

Compușii cetonici ca: acetona, acidul acetilacetic, acidul  $\beta$ -oxibutiric apar frecvent în urină la copii, sint de asemenea prezenți în diabet, în stările infecțioase, în dezechilibrul hidromineral, în toxicoză gravidică. Cantitatea cea mai mare apare în coma diabetică.

Apariția de corpi cetonici duce la o modificare a rezervei alcaline și chiar a pH-ului în sensul unei acidoze.

În diabet, apariția acetonuriei precede apariția accidentelor comatoase.

### DETERMINAREA ACETONEI

#### 1. Metoda Imbert Bonnamour

Principiu: acetona în mediu alcalin dă cu nitroprusiatul de sodiu o culoare roșu-violacee.

**Reactivi:** acid acetic glacial  
soluție nitroprusiat de sodiu 10 g% ml apă  
amoniac concentrat

**Modul de lucru:** într-un balon Erlenmayer se pipetează:

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| — urină .....                 | 10 ml  |
| — acid acetic .....           | 0,5 ml |
| — nitroprusiat de sodiu ..... | 0,5 g  |

Se lasă apoi cu grijă să cadă la suprafața lichidului 20 picături de amoniac. În prezența acetonei apare un inel roșu-violet la limita de separare între cele două lichide. Intensitatea culorii inelului variază cu concentrația corpurilor cetonici.

Determinarea cantitativă se face prin diluarea urinei.

Sensibilitatea reacției este de 40—80 mg acetona la 1 000 ml urină. Culori asemănătoare dau urații amorfi, creatinina și medicamentele care conțin aloesau fenoltaleina.

## 2. Metoda Gerhardt

**Principiu:** acidul acetilacetic dă un compus de culoare roșu-bordo sau violet în prezența soluției de clorură ferică.

**Reactivi:** clorură ferică 10%.

**Modul de lucru:** se pipetează într-o eprubetă 10 ml urină proaspătă ca atare sau defecată, la care se adaugă clorură ferică 10% până la redizolvarea precipitatului de fosfat feric format.

Se face un martor adăugând aceeași cantitate de clorură ferică la 10 ml H<sub>2</sub>O distilată.

**Rezultate:** În prezența acidului acetilacetic sau a acetonei apare o culoare roșie închis. Acidul acetilacetic prin încălzire moderată se transformă în acetona.

În cazul în care urina a fost fiartă și nu mai apare culoarea roșie, faptul se datorește prezenței unor medicamente ingerate (derivați salicilați, derivați de fenol etc.).

## 3. Metoda Rothera. Principiul metodei este același ca la metoda anterioară.

Reactiv Rothera (praf care se păstrează timp îndelungat):

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| nitroprusiat de sodiu .....    | 200 g |
| carbonat de sodiu anhidru .... | 200 g |
| sulfat de amoniu .....         | 200 g |

Aceste substanțe sint amestecate perfect într-un mojar.

**Modul de lucru:** într-un godeu sau pe o lamă de sticlă se pune un vîrf de cuțit din reactiv și se adaugă urina de cercetat pînă se formează o pastă. Cînd reacția este pozitivă amestecul se colorează în violet, iar intensitatea culorii este proporțională cu concentrația corpurilor cetonici.

## DETERMINAREA ACETONEI ȘI A ACIDULUI ACETILACETIC

### Metoda Legal

**Principiu:** același ca la metoda Imbert Bonnamour

**Reactivi:** nitroprusiat de sodiu 10 g% ml apă

|                           |               |
|---------------------------|---------------|
| acid acetic glacial ..... | 99 %          |
| hidrat de sodiu .....     | 40 g % ml apă |



**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| urină .....                     | 5 ml |
| nitroprusiat de sodiu 10% ..... | 1 ml |
| hidroxid de sodiu 40% .....     | 2 ml |
| se agită și se adaugă           |      |
| acid acetic glacial .....       | 2 ml |

Imediat în prezența acetonei apare culoarea roșie. Culoarea verde indică lipsa acetonei și prezența indicanului.

#### DOZAREA ACIDULUI $\beta$ -OXIBUTIRIC

**Principiu:** acidul  $\beta$ -oxibutiric dă cu nitroprusiatul de sodiu colorație roșie violetă.

Această dozare se efectuează numai pe urinale care conțin acid acetic sau acetonă.

După prealabila eliminare prin fierbere a acetonei existente și a celei rezultate din acidul acetic se pune în evidență acidul  $\beta$ -oxibutiric.

**Reactivi:** acid acetic 10%

apă oxigenată ..... 20%

ser fiziologic 9 g NaCl ‰ ml apă

acid acetic glacial concentrat

nitroprusiat de sodiu 10%

amoniac ..... 20%

**Modul de lucru:** într-un balon Erlenmayer se pipetează:

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| urina .....           | 20 ml  |
| apă .....             | 20 ml  |
| acid acetic 10% ..... | 0,5 ml |

Se fierbe pînă la un volum de 20 ml, se repartizează în 2 eprubete.

|                                     | Proba | Martor |
|-------------------------------------|-------|--------|
| urina .....                         | 10 ml | 10 ml  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | 1 ml  | —      |
| ser fiziologic .....                | —     | 1 ml   |

se încălzește 1' la 60° și apoi se răcește

|                             | Proba  | Martor |
|-----------------------------|--------|--------|
| acid acetic glacial .....   | 0,5 ml | 0,5 ml |
| nitroprusiat de sodiu ..... | 0,5 ml | 0,5 ml |
| amoniac 20% .....           | 2 ml   | 2 ml   |

Se amestecă și se face citirea: în cazul reacției pozitive: în eprubeta P, la care s-a adăugat apa oxigenată va apărea un inel colorat în violet-roșu pe cînd în eprubeta M soluția rămîne incoloră.

#### PIGMENTII BILIARI

Urina normală, proaspăt emisă, conține numai urobilinogen care, prin oxidarea la lumină, trece în urobilină. De aceea în urina proaspătă trebuie să căutăm urobilinogenul, iar în cea care a stat cîteva ore, urobilina.

Practic se determină ambele substanțe deodată.

### 1. Metoda cu acid azotic

*Reactivi:* acid azotic concentrat

*Modul de lucru:* se udă cu urina o hîrtie de filtru și se pune în mijloc o picătură de acid azotic. Apariția unor inele colorate verzui indică prezența bilirubinei și a biliverdinei.

### 2. Metoda cu soluție Lugol

*Reactivi:*

— soluție Lugol (soluție alcoolică de iod 1%).

*Modul de lucru:* la 10—15 ml urină pipetați într-o eprubetă se lasă să curgă încet pe fundul eprubetei dintr-o pipetă efilată circa 2 ml reactiv Lugol.

Apariția unui inel verde în zona de contact a celor două soluții indică prezența bilirubinei.

### 3. Metoda Gmelin-Rosenbach

*Principiu:* bilirubina în contact cu acidul azotic care conține o cantitate mică de acid azotos prezintă diferite culori: verde, albastru, violet, roșu și galben, culori ce apar succesiv și care corespund diferitelor faze de oxidare ale bilirubinei.

Reactivul oxidant: — acid azotic concentrat ..... 5 ml  
— nitrit de sodiu cristalizat ..... 0,005 mg

*Modul de lucru:* urina proaspăt emisă se filtrează. Filtrul se întinde pe o placă de porțelan. Din reactivul oxidant se ia o picătură și se depune pe hîrtia de filtru în mijlocul ei.

În prezența bilirubinei apare o pată roz. Pe măsură ce acidul va difuza în hîrtia de filtru, pata roz va fi înconjurată de cercuri colorate violet, albastru și verde.

### 4. Metoda Grimbart

*Principiu:* se precipită bilirubină cu o soluție de bariu sub formă de bilirubinat de bariu.

*Reactivi:*

1. clorură de bariu ..... 10%

2. alcool — acid clorhidric:

HCl concentrat ..... 5 ml

alcool 96° ..... 95 ml

3. apă oxigenată ..... 10%.

*Modul de lucru:* într-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

urină ..... 10 ml

clorură de bariu 10% ..... 5 ml

Se agită, se obține un precipitat de fosfat, sulfat și eventual bilirubinat de bariu. Se centrifughează iar precipitatul se reia în 10 ml apă distilată pentru spălare. După o, a doua centrifugare precipitatul spălat se reia în 5 ml alcool-clorhidric, se fierbe 1 minut pe baie de apă și apoi se centrifughează.

### 5. Metoda Fouchet

*Principiu:* identic cu cel de la metoda Grimbart:



### Reactivi:

|                          |        |        |
|--------------------------|--------|--------|
| clorură de bariu .....   | 10 g%  | ml apă |
| reactiv Fouchet          |        |        |
| acid tricloracetic ..... | 25 g   |        |
| apă distilată .....      | 100 ml |        |
| clorură ferică 10% ..... | 10 ml  |        |

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| urină .....                 | 10 ml |
| BaCl <sub>2</sub> 10% ..... | 5 ml  |

Se agită și se filtrează pe hirtie de filtru.

Se întinde hirtia cu precipitat și direct pe precipitat din loc în loc se adaugă 1—2 picături de reactiv Fouchet.

### Rezultate:

În prezența pigmentilor biliari apare o culoare verde-albastru.

### 6. Metoda Schlessinger I

Reacția se bazează pe fluorescența pe care o dă urobilina cu acetatul de zinc.

### Reactivi:

|                                                            |        |
|------------------------------------------------------------|--------|
| — acetat de zinc .....                                     | 10 g%  |
| — alcool 96° (reactivul se agită înainte de întrebuințare) |        |
| — soluție Lugol:                                           |        |
| iod metalic .....                                          | 1 g    |
| iodură de potasiu .....                                    | 2 g    |
| apă distilată .....                                        | 100 ml |

**Modul de lucru:** într-un balon se pipetează:

|                          | Probă        |
|--------------------------|--------------|
| urină .....              | 20 ml        |
| acetat de zinc 10% ..... | 20 ml        |
| soluție Lugol .....      | 2—3 picături |

Se agită câteva minute, se lasă în repaus 24 ore, se filtrează. Se apreciază efectul prin reflexie pe un fond întunecos, fluorescența verde indică prezența bilirubinei.

### 7. Metoda Zins.

**Principiu:** precipitatul de bilirubinat de bariu obținut prin tratarea urinei cu clorură de bariu, dă cu o soluție de acid tricloracetic o culoare verde.

**Reactivi:** soluție nitrit de sodiu 1 g %  
soluție acid tricloracetic 20 g %  
clorură de bariu cristale

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

|                          |              |
|--------------------------|--------------|
| — urină .....            | 10 ml        |
| — nitrit de sodiu .....  | 0,1 ml       |
| — clorură de bariu ..... | 2—3 cristale |

Se agită puternic, se filtrează. Pe filtru rămâne precipitatul de bilirubinat de Ba. Se întinde hirtia de filtru cu precipitatul și se adaugă din loc în loc o picătură de acid tricloracetic. În prezența unei cantități foarte mici de bilirubină apare culoarea verde, în prezența urobilinei apare culoarea violet.

## 8. Metoda Popper

*Principiu:* oxidarea bilirubinei în biliwerdină

*Reactivul Popper* conține:

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| — iodură de potasiu .....   | 12 g    |
| — clorură de sodiu .....    | 75 g    |
| — tinctură de iod 10% ..... | 3,5 ml  |
| — alcool 96° .....          | 125 ml  |
| — apă .....                 | 525 ml. |

*Modul de lucru:* se pipetează într-o eprubetă:

|                      |       |
|----------------------|-------|
| urină .....          | 10 ml |
| reactiv Popper ..... | 3 ml  |

Reactivul Popper se pipetează cu precauție ca să nu se amestece cele două lichide. Se folosește pipeta Pasteur efilată la vîrf, care se introduce pînă în fundul eprubetei.

Prezența bilirubinei este pusă în evidență prin apariția unui inel verzui de bilirubină la limita de separare a celor două lichide. Reactivul Popper poate fi înlocuit cu o soluție de iod 6% în alcool de 96°.

## 9. Metoda Schlessinger II

*Principiu:* urobilina în lumină violetă dă o fluorescență verde cu acetatul de zinc în mediul alcoolic.

*Reactivi:* — Soluția alcoolică de acetat

de zinc 10%

acetat de zinc .....

10 g

alcool 96° .....

100 ml

— soluție clorură de calciu 10 g%

— acid acetic glacial

— soluție amoniac 20%

*Modul de lucru:* într-o eprubetă se pipetează:

|                        |      |
|------------------------|------|
| — urina .....          | 2 ml |
| — acetat de zinc ..... | 2 ml |

se amestecă și se filtrează, se examinează la lumină ultravioletă pe fond negru. O fluorescență verde indică prezența urobilinei.

*Observații:* dacă urina conține bilirubină aceasta se îndepărtează astfel:

— urină .....

2 ml

— soluție clorură de calciu ....

2 ml

— amoniac .....

2 ml.

Se agită și se filtrează. În filtrat se pun cîteva picături de acid acetic pentru acidificare și se face reacția de mai sus.

## 10. Metoda Ehrlich

*Principiu:* metoda se bazează pe culoarea roșie pe care o dă urobilino-genul cu paradimetilaminobenzaldehida în mediu acid.

*Reactivi:*

Reactivul Erlich:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| — paradimetilaminobenzaldehidă | 5 g    |
| — HCl concentrat (d = 1,19) .. | 150 ml |
| — apă distilată .....          | 150 ml |



Recoltarea urinei: bolnavul va ingera alimente fără proteină și clorofilă. Cantitatea de lichide ingerate variază de la 1500—2000 ml pe zi. Urina se recoltează între 6—18 ore, din 2 în 2 ore. Urina de noapte constituie o singură probă.

Reactivul Ehrlich dă o colorație roșie și cu alte produse biologice: proteine, indican, indol, scatol, de asemenea cu urina normală concentrată.

Pentru îndepărtarea acestor surse de false interpretări se diluează urina proaspătă de la 1/10 la 1/160.

*Modul de lucru:* la aceste diluții în volum final de 10 ml se adaugă 1ml reactiv Ehrlich. După 3—5 minute se apreciază rezultatele:

Reacție negativă — culoarea urinei este neschimbată:

|   |    |   |   |   |                                                        |
|---|----|---|---|---|--------------------------------------------------------|
| " | ±  | — | " | " | indică o ușoară înroșire                               |
| " | +  | — | " | " | roșu intens apare după 10 minute                       |
| " | ++ | — | " | " | roșu intens apare imediat și persistă timp îndelungat. |

Determinarea urobilinogenului în urină se face timp de câteva zile. Rezultatele sînt cu atît mai exacte cu cît numărul zilelor de probă este mai mare, în general sînt suficiente 3 zile.

## SĂRURILE BILIARE

Acizii biliari existenți în urinele icterice se găsesc sub formă de săruri de sodiu ca: taurocolatul și glicocolatul de sodiu.

### 1. Metoda Hay

*Principiu:* prezența sărurilor biliare duce la scăderea tensiunii superficiale a urinei.

*Reactivi:* sulf precipitat (floare de sulf)

*Modul de lucru:* la 20—30 ml urină într-un pahar conic, se presară cu o spatulă fină o mică cantitate de sulf precipitat. În prezența sărurilor biliare sulful cade la fundul vasului sub formă de ploaie în cel mult 5 minute. În caz contrar plutește la suprafața urinei. Reacția nu este specifică, tensiunea superficială a urinei scade și în prezența alcoolului, cloroformului și acizilor salicilici și acetic.

### 2. Metoda Pettenkofer

*Principiu:* Acidul colic provenit din scindarea acizilor biliari în prezența furfuralului dă o culoare roșie-violetă.

*Reactivi:* alcool absolut

eter sulfuric

Cărbune animal

Acid sulfuric

Soluție de zaharoză 1%

*Modul de lucru:* extragerea sărurilor biliare: se evaporă pe baie de apă la fierbere, 200 ml urină.

Reziduul uscat se dizolvă în alcool absolut și se filtrează; filtratului i se adaugă eter, care precipită sărurile biliare; se filtrează din nou, se dizolvă precipitatul în apă distilată. Se agită soluția cu cărbune animal și se filtrează a treia oară.

Peste filtrat se adaugă:

|                          |       |            |
|--------------------------|-------|------------|
| acid sulfuric diluat 1/2 | ..... | 4 ml       |
| urină                    | ..... | 1 ml       |
| soluție zaharoză 5%      | ..... | 3 picături |

În prezența sărurilor biliare apare un inel roșu-violet caracteristic.

#### Rezultate

În icterele hepatice bilirubina din urină este însoțită de acizi biliari. În icterul mecanic bilirubina din urină este însoțită de sărurile biliare. În icterul hemolitic urina nu conține nici pigmenți, nici săruri biliare, ci o cantitate crescută de urobilină.

### PIGMENTII SINGELUI

Punerea în evidență a pigmentilor sanguini în urină se face, prin examen spectroscopic, microscopic și examen chimic.

**Examen spectroscopic.** Hemoglobina are un spectru de absorbție caracteristic.

**Examen microscopic.** Sedimentul urinar este pus între lamă și lamelă, examinat la microscop, întâi cu obiectivul mic apoi cu obiectivul mare. În caz că urina conține pigmenți sanguini se pot vedea în câmpul microscopic eritrocite.

**Examenul chimic.** Principiul metodelor folosite în acest scop se bazează pe faptul că hematina avînd proprietăți peroxidazice descompune apa oxigenată care oxidează reactivul folosit schimbîndu-i-se culoarea. Metodele curențe sînt:

#### 1) Metoda Adler

**Reactivi:** benzidină pură  
acid acetic glacial

apă oxigenată: { perhidrol ..... 10 ml  
                  { apă distilată ..... 90 ml

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

|                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| urină .....               | 2 ml            |
| benzidină .....           | 1 vîrf de cuțit |
| acid acetic glacial ..... | 0,3 ml          |

agitare

---

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Apă oxigenată ..... | 0,2 ml. |
|---------------------|---------|

În prezența pigmentilor sanguini apare o culoare care virează de la verde la albastru prin oxidarea benzidinei de către hemoglobină în prezența apei oxigenate.

#### 2) Metoda Mayer

**Reactivi:** reactiv Mayer:

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| hidroxid de potasiu ..... | 20 g   |
| apă distilată .....       | 100 ml |
| fenoltaleină .....        | 2 g    |
| pulbere de zinc .....     | 10 g   |

Se fierbe încet pînă la decolorarea completă. Se filtrează fierbinte într-o sticlă brună conținînd puțină pulbere de zinc (pentru conservare).

— Apă oxigenată 10%.

**Modul de lucru:**

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| — urină .....         | 3 ml       |
| — reactiv Mayer ..... | 1 ml       |
| apă oxigenată .....   | 3 picături |



**Rezultate:** în prezența pigmentilor sanguini apare o colorație roșie datorită oxidării fenoltaleinei incoloră în mediu alcalin de către hemoglobină în prezența apei oxigenate. Metodele de mai sus Adler și Mayer folosite pentru punerea în evidență a pigmentilor sanguini pot fi aplicate și direct pe sedimentul urinar.

## PORFIRINE ÎN URINĂ

Porfirinele extrase din lichidele biologice cu solvenți organici prezintă benzi de absorbție caracteristice între  $\lambda = 396-410 \text{ m}\mu$ .

### DETERMINAREA COPRO- ȘI UROPORFIRINELOR

#### Reactivi:

eter

soluție acid clorhidric 10%

acid acetic glacial

acetat de etil

amestec acetat de etil-acid acetic (1:3).

**Modul de lucru:** într-o pilnie de separare se introduc:

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| urină proaspătă .....     | 10 ml |
| acid acetic glacial ..... | 2 ml  |
| eter .....                | 20 ml |

Se agită și se decantează în cilindrii cu dop rotat

faza eterică

I  
coproporfirinele

+  
5 ml HCl 10%

culoarea roz a fazei acide indică  
prezența coproporfirinelor.

faza apoasă

II  
uroporfirinele

+  
v/v amestec de acetat de etil se  
agită și se decantează.

În stratul de acetat de etil se adaugă:  
5 ml HCl 10%

culoarea roz a solventului indică prezența uroporfirinelor.

Culoarea roșie variază în raport cu concentrația porfirinelor de la carmin deschis la roșu roz și roșu cărămiziu.

Porfirinele pot fi puse în evidență prin fluorescența dată în lumina ultravioletă. Citirile se fac la maximum 2 ore de la terminarea reacțiilor.

Dacă extractul este incolor examinarea se face la lampa cu vapori de mercur folosind un filtru de sticlă neagră care oprește spectrul vizibil și lasă să treacă razele ultraviolete.

Prezența singelui în urină dă erori importante în determinarea porfirinelor, motive pentru care cercetarea singelui în acest caz este obligatorie.

**Rezultate:** în mod normal proba este negativă.

Probele pozitive sînt întotdeauna patologice. În urina din 24 ore cantitatea de coproporfirină este de  $150 \mu\text{g}$  pe cînd uroporfirina nu este dozabilă, există numai urme.

Toluolul, timolul, izopropanolul și oxicianura de mercur sînt substanțe curenț folosite pentru conservarea urinei 24 ore.

## DETERMINAREA PORFOBILINOGENULUI

Reactiv Ehrlich:

paradimetilbenzaldehydă ..... 2 g  
acid clorhidric 20% ..... 100 ml

*Modul de lucru:*

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| urină .....           | 5 ml   |
| reactiv Ehrlich ..... | 2,5 ml |
| cloroform .....       | 2,5 ml |

Se agită și se lasă în repaus 1 oră.

Prezența porfobilinogenului este pusă în evidență prin colorația roșie a fazei necloroformice.

Spectrul de absorbție este caracterizat prin două benzi la  $\lambda = 525-553\text{m}\mu$ .

*Interpretări:* rezultatele pozitive sînt prezente în leziunile hepatice ca icter și ciroză și în porfiria congenitală și acută. De asemenea rezultatele sînt pozitive în afecțiunile tractului digestiv, constipație, avitaminoze, în intoxicații cu plumb, bismut, sulfamide.

Rezultatele pozitive se datoresc tulburărilor metabolismului porfirinelor provocat de:

- scăderea cantității de fier necesar sintezei de protoporfirină;
- inhibarea inserării fierului pe nucleul de protoporfirină de natură alimentară sau enzimatică.

## TESTE RAPIDE PENTRU INVESTIGAȚIA BIOCHIMICĂ DE UZ CURENT

Folosirea testelor rapide este tendința actuală a laboratorului clinic. Avantajele prezentate de aceste teste sînt: rapiditatea execuției și obținerii rezultatelor, o specificitate bună; posibilitatea executării lor fără o dotare specială și randament mare.

Testele rapide se practică cu ajutorul unor tablete, benzi sau pulberi reactive.

I. Teste rapide de investigație a *urinii*:

a) Pentru determinarea unei singure componente:

- teste pentru determinarea proteinelor;
- „ „ „ glucozei;
- „ „ „ substanțelor reducătoare;
- „ „ „ prezenței singelui;
- „ „ „ corpurilor cetonici;
- „ „ „ bilirubinei.

b) Teste combinate:

- albumina, glucoza, acetona, pH
- determinarea acidului fenilpiruvic și paraaminosalicilic;

II. Teste rapide pentru investigarea *materiilor fecale*:

a) Teste pentru decelarea prezenței singelui:

III. Teste rapide de investigație a *singelui*:

- teste pentru dozarea: glucozei, ureei, corpurilor cetonici, bilirubinei, colinesterazei, fosfatazelor.

La noi în țară laboratorul „Galenica“ prepară pentru început următoarele teste rapide:



## PENTRU URINĂ:

1) — detectarea acetonei: pulbere reactiv ce conține nitroprusiat de sodiu și săruri alcalinizante ce se colorează în violet în prezența acetonei și rămâne necolorată la urinale normale. Diferitele intensități de culoare ce corespund la concentrații variate de acetonă în urină se compară cu o scală colorată a concentrațiilor de acetonă.

2) — detectarea glucozei: benzi impregnate cu o soluție ce conține sulfat de cupru și săruri alcalinizante. Colorația galben-brun ce apare în cazurile în care glucoza e prezentă se compară cu o scală colorată a concentrațiilor de glucoză furnizind aprecieri cantitative orientative.

3) — detectarea bilirubinei: benzi impregnate cu clorură de bariu și azotat de sodiu însoțite de o soluție revelatoare. Intensitatea culorii verzi ce apare în caz de prezență a bilirubinei e proporțională cu concentrația bilirubinei urinare și se compară cu o scală de culori.

4) — pentru decelarea proteinelor: benzi pentru orientări cantitative ce se compară cu o scală de culori.

## PENTRU DECELAREA PIGMENTILOR SANGUINI:

Testul se poate aplica la orice produs biologic (fecale, vărsături, LCR, revărsări pleurale sau ascită) pregătit ca pentru decelarea hemoragiilor oculte.

Pulberea reactivă se colorează albastru de diferite intensități în funcție de cantitatea de pigment sanguin prezent care se compară cu o scală de culori.

## EXAMENUL MICROSCOPIC AL URINII

Examenul microscopic se face pe sedimentul urinii proaspete, la cel mult 6 ore de la emisie. Dacă sedimentul este bogat va lăsa urina în repaus într-un tub conic și se va lua cu o pipetă Pasteur sediment din fundul tubului.

Dacă urina este săracă în sediment, este necesară o centrifugare de 3—6 minute, la 1500—2500 t/minut. Se elimină supernatantul și se lucrează pe sediment. Centrifugările la turații mari sînt evitate, distrugînd elementele figurate.

Sedimentul se picură cu o pipetă Pasteur pe o lamă curată, iar lama se acoperă apoi cu o lamelă, evitîndu-se formarea de bule de aer.

Preparatul se examinează la microscop, cu obiectivul mic pentru a stabili prezența elementelor celulare și a cristalelor, urmînd apoi studiul microscopic cu obiectivul mare.

## ELEMENTE FIGURATE

În urinale normale se întîlnesc celule epiteliale plate care sînt foarte mari, poliedrice, mai rar rotunde cu nucleu mic și protoplasmă de culoare deschisă, fin granulată.

La femei ele sînt prezente în număr mai mare decît la bărbați și provin din vagin. Dacă sînt foarte numeroase, ele provin din vezică și indică inflamația căilor urinare inferioare. Dacă sînt puțin numeroase și însoțite de filamente uretrale, ele provin din uretră.

Pentru a evita prezența în sediment a elementelor secreției vaginale care conține pe lângă epitelii poligonale leucocite, hematii, coci etc., se recomandă ca recoltarea urinei să se facă după o prealabilă toaletă vulvară cu apă și săpun, iar în cazul unei leucoree sau secreții vaginale abundente, cu un mic tampon de vată intravaginal.

**Celulele rotunde**, zise renale, sînt ovale sau poligonale mici, însă ceva mai mari decît leucocitele și au un nucleu caracteristic mare, rotund, veziculos, protoplasma granulară, adesea colorată în brun, care conține picături de grăsime. Diferențierea lor față de leucocite este uneori dificilă din cauză că leucocitele în urinale alcaline pot căpăta forma celulelor renale. Celulele renale izolate nu se pot deosebi morfologic de alte celule epiteliale. Uneori apar în grămezi în formă de morulă. Ele pun în evidență o inflamație cronică bazinetală.

**Celulele cilindrice** sînt mai mici decît celulele epiteliale și au formă caracteristică.

**Levurile** sînt rotunde sau ovale, de mărimi inegale, desgrupate, cîte două sau mai multe, nu au dublu contur și au o refringență caracteristică.

**Celulele tumorale.** Prezența unui neoplasm poate fi suspectată, dacă urina conține sînge și mici aglomerări de celule mononucleare. Pot fi decelate uneori și fragmente de țesut tumoral prin colorarea sedimentului urinar cu albastru de metilen.

**Leucocitele** au aspectul unor globule sferice granulate de mărimi diferite. Un număr mic de leucocite este prezent în urina normală. Provin din căile urinare și rinichi. Cînd numărul lor este foarte mult crescut formează puroiul și indică o inflamație a căilor urinare sau o infecție a căilor urinare. Leucocitele au unul sau mai mulți nuclei și pot fi izolate, în grămezi sau înglobate în cilindri. Ele sînt intacte în urina acidă și deformate în urina alcalină. Nucleii sînt de obicei distincți sau acoperiți de granulații. Adăugarea de 1—2 picături de acid acetic 10% aduce o clarificare. Adăugarea se va face cu atenție, căci acidul acetic lizează eritrocitele.

**Eritrocitele** sînt rotunde, perfect conturate și se găsesc în număr foarte redus în urina normală; ele pot fi diferențiate de levuri, care sînt adesea sferice, prin faptul că, mișcînd viza micrometrică, hematiile apar cu contur dublu și sînt de culoare gălbuie, iar adăugarea de cîteva picături de acid acetic 10% le lizează imediat. Cercetarea lor trebuie efectuată pe urini proaspete. În urinale concentrate acide, ele se pot deforma devenind crenelate, iar în urinale alcaline se îmbibă, devenind rotunde.

Prezența lor în cantitate mare în urină poate da o colorație roșiatică. Testul pentru hemoragii oculte poate fi negativ, cînd sînt puține hematii în urină, cam 10—15 pe cîmpul microscopic. Se va vedea dacă sîngele nu provine din căile genitale prin traumatism sau prin sondaj. Eritrocitele izolate se întîlnesc des după menstruație și mai rar înaintea acesteia.

**Cilindrii urinari.** Sînt formațiuni proteice, rotunde, alungite sau cilindrice. Proveniența lor se explică astfel: alterarea peretelui tubilor urinari lasă să se acumuleze în lumenul lor exsudate proteice care se coagulează sub influența pH-ului acid al urinei. Forma pe care o capătă este a tubului unde a luat naștere și apar în urină sub forma unor mase cilindrice alungite. Au dimensiuni variabile, dar mari în raport cu celelalte elemente ale urinei. Cilindrii apar în aceleași condiții ca și proteinuria. Nu există nici un raport direct



între proteinurie și numărul cilindrilor. Există proteinurii intense fără cilindurie concomitentă. Cilindrii sînt de două feluri: adevărați și pseudocilindri. Cilindrii adevărați sînt: cilindrii hialini, granuloși, hematici, leucocitari și epiteliali. Prezența cilindrilor hematici în sediment este de mare importanță pentru diagnostic, deoarece pune în evidență un proces patologic în rinichi. Cînd urina stă în repaus mai mult timp se poate produce o dizolvare a cilindrilor, mai ales în urinale alcaline. O centrifugare prea puternică produce de asemenea o distrugere a cilindrilor. Cilindroiții, cilindrii de urați, acid uric, bacterieni și hemoglobinici sînt pseudocilindri.

### CILINDRII ADEVĂRAȚI

Cilindrii granuloși reprezintă de obicei o lezare gravă a celulelor renale, iar cilindrii epiteliali pot indica eliminarea celulelor renale. De aceea cînd găsim celule renale în urină se caută cu atenție și asemenea cilindri.

Cilindrii hialini sînt incolori și omogeni, adesea fiind necesară colorarea cu albastru de metilen 1%. Uneori, pe suprafața lor se pot depune săruri simîlînd cilindrii granuloși. Cilindrii hialini apar în proteinurie, indicînd totodată existența unui proces patologic. Se întîlnesc în diferite tipuri de nefrite.

Cilindrii granuloși sînt scurți, friabili, formați din granulații fine. Sînt cei mai importanți, apar în procese patologice renale grave; prezența lor indicînd o nefrită.

Cilindrii fibroși prezintă aspect de reticuli speciali de fibrină de colorație gălbuie, de origine sanguină, ei indicînd existența unei congestii renale.

Cilindrii grăsoși conțin picături de grăsime, se colorează în roșu puternic cu Sudan III. Sînt insolubili în acid acetic. Sursa picăturilor de grăsime este de obicei degenerescența grasă a celulelor epiteliale.

Cilindrii epiteliali. Existența lor este foarte rară. Ei conțin celule epiteliale din tubii renali. Adăugarea de acid acetic diluat 10% produce o clarificare a nucleilor.

Cilindrii hematici sînt formați din globule roșii cu elemente bine conservate sau uneori degenerate. Prezența lor dovedește că sîngele provine chiar din rinichi. Se întîlnesc în nefrita hemoragică acută, ei indicînd o glomerulonefrită.

Cilindrii leucocitari sînt formați din celule rotunde, mici și granuloase. Cilindrii leucocitari puri se găsesc mai rar și prezența lor denotă o pîonefrită sau o pielonefrită. Mai des, leucocitele se depun pe cilindrii de mucus, hialini sau alții.

Cilindrii comatoși sînt formați din granule mici refringente, cu porțiuni hialine. Apar în coma diabetică sau înainte ei.

Cilindrii ceroși sînt un semn al unei leziuni grave a parenchimului renal mai frecvent în procesele cronice decît în cele acute. Sînt formațiuni omogene cu un luciu mat care îi deosebește de cilindrii hialini, sînt refringenți cu marginile nete cu incizuri.

Cilindrii adevărați sau pseudocilindrii pot fi confundați cu fire de ață, fire de lînă sau peri. Imaginea lor este redată în fig. 28.

Firele de in și cîneapă sînt mult mai grosolane decît cilindrii adevărați. Ele prezintă îngroșări și noduri, iar lumenul lor este îngust și uneori dispăre cu

totul. Fibrele de bumbac au forma unor spirale îngroșate sau a unor panglici răsucite în jurul axei lor. Mătasea este alcătuită din fire strălucitoare, duble, cilindrice și nestructurate.

Firele de lână au la suprafață celule epidermice, cu formă neregulată, caracteristică, de țigle. Firele de păr (pubian) sînt foarte lungi; au o culoare brună și sînt aproape omogene.

### PSEUDOCILINDRII

Pseudocilindrii pot fi de origine organică sau anorganică. Cei formați din săruri se pot confunda cu cei granuloși. Prin încălzire se dizolvă cei de urați, iar prin adăugare de acid acetic, cei de fosfați; pseudocilindrii formați din grămezi de microbi se pot recunoaște prin colorare bacteriologică.

Filamentele de mucus se prezintă ca niște șuvițe lungi semănînd cu cilindrii hialini, dar mai subțiri, asemenea unor panglici îngustate spre capete.

Cilindroiizii nu trebuie confundați cu cilindrii hialini. Au transparența lor, dar au aspect de panglici sau filamente, mai aplatizați și striati longitudinal. Au diametrul inegal, adesea fiind ramificați; traversează de obicei mai multe câmpuri microscopice. Nu au semnificație patologică; putîndu-se găsi și în urinile normale.

Imaginea microscopică a elementelor figurate este redată în figurile 36, 37.

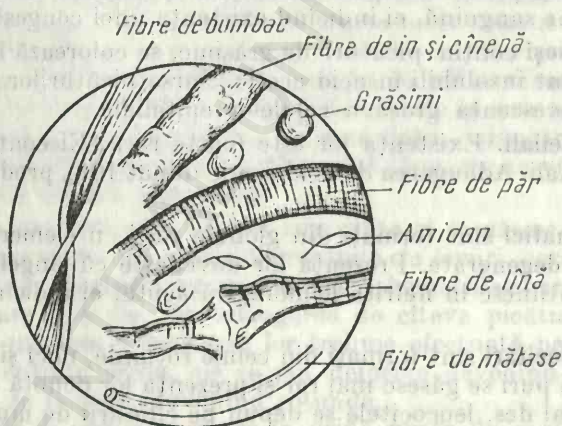


Fig. 36. — Impurități în sedimentul urinar.

### ELEMENTELE CRISTALIZATE

În urina acidă se pot pune în evidență acidul uric, urații, oxalatul de calciu și cisteina.

În urina alcalină se pot constata: fosfatul amoniaco-magnezian, fosfatul bi- și tricalcic, carbonatul de calciu, uratul de amoniu. Unele din aceste cristale pot apărea și în urina neutră. Imaginea microscopică a elementelor cristalizate este redată în figura 38.



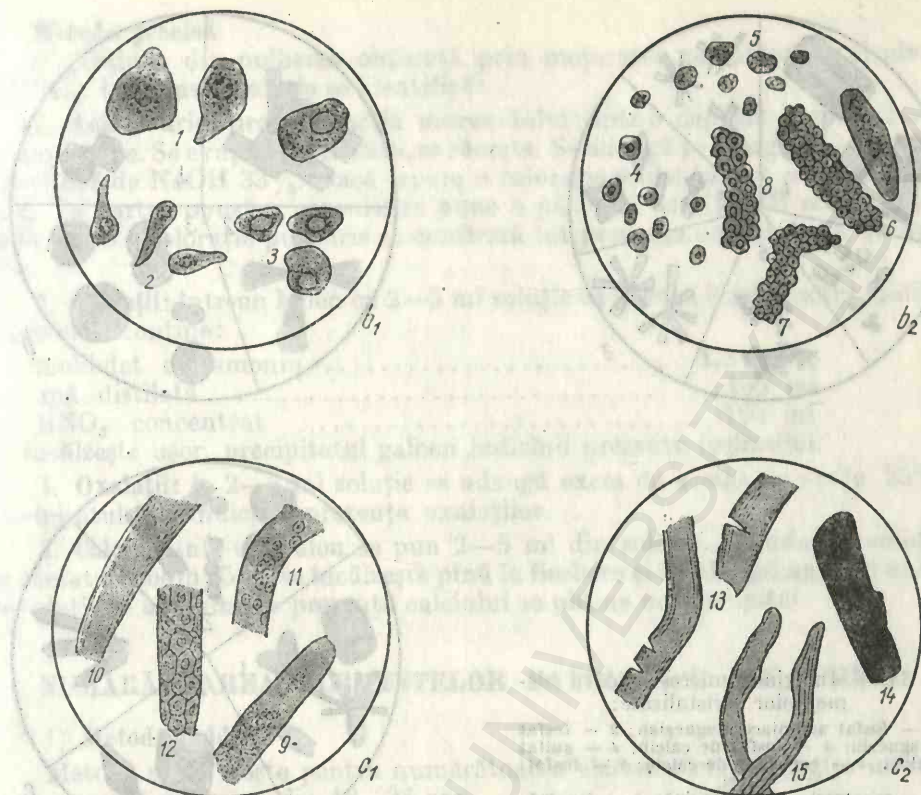


Fig. 37. — Imaginea microscopică a elementelor figurate din urină.

- a — Ansamblul sedimentului urinar: 1 — hematii; 2 — leucocite; 3 — celulă epitelială în rachetă; 4 — celule epiteliale plate; 5 — celule renale; 6 — leucocite cu degenerescență grasă; 7 — cilindroid; 8 — cilindri hialini; 9 — cilindri granuloși; 10 — cilindri hialini cu epiteli; 11 — cilindri hialini cu leucocite; 12 — cilindri leucocitari; 13 — levuri; 14 — spermatozoizi; 15 — cilindri hematoci; 16 — cilindri ceroși.
- b — Celule izolate și grupate: 1 — celulă epitelială plată; 2 — celulă în rachetă; 3 — celule renale și celule cu degenerescență vasculară; 4 — hematii; 5 — leucocite; 6 — cilindri hematoci; 7 — cilindri leucocitari; 8 — cilindri epiteliali.
- c — Cilindri: 9 — cilindri granuloși; 10 — cilindri hialini; 11 — cilindri hialini cu leucocite; 12 — cilindri hialini cu epiteli renale; 13 — cilindri ceroși; 14 — cilindri granuloși; 15 — cilindroidi.

#### ANALIZA CALCULILOR

Analiza calculilor constă în:

- examen macroscopic și
- examen chimic.

**Examenul macroscopic:** număr, mărime, suprafață, aspect, culoare, greutate, structură pe secțiune, amorf sau cristalizat.

Acid uric: culoare galbenă, pe secțiune straturi concentrice.

Urat de amoniu: galben.

Fosfat amoniaco-magnezian: alb-cenușiu, galben-cenușiu, ușor friabil.

Oxalat: dur, aspect reniform, culoare alb-brun-negru-cărmiziu.

**Examenul chimic:** se face pe calculii mojarăți pînă la stadiul de pulbere. Metodele de analiză pot fi orientative sau mai precise.

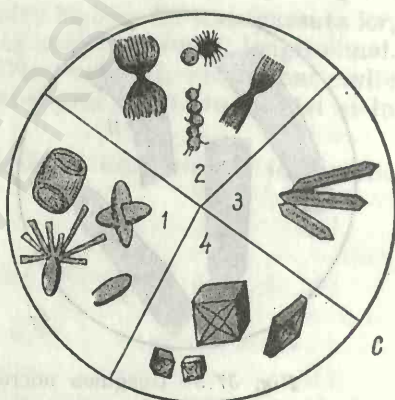
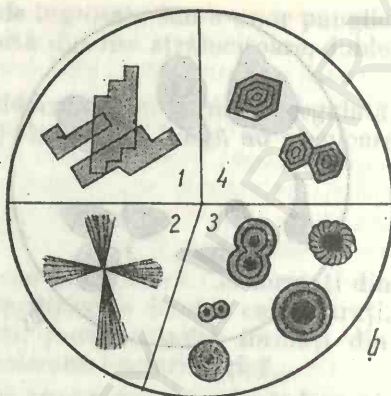
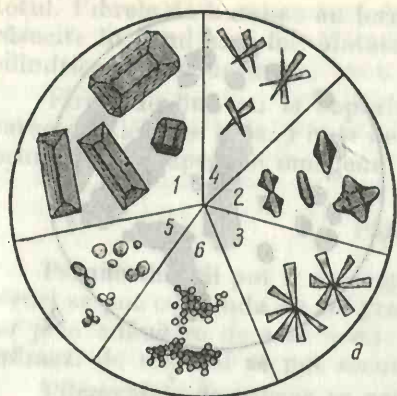


Fig. 38. — Imaginea microscopică a elementelor cristalizate:

- a) 1 — fosfat amoniaco-magnezian; 2 — fosfat de magneziu; 3 — fosfat de calciu; 4 — sulfat de calciu; 5 — carbonat de calciu; 6 — fosfați teroși.  
 b) 1 — colesterol; 2 — tirozină; 3 — leucină; 4 — cistină.  
 c) 1 — acid uric; 2 — urat de amoniu; 3 — acid hipuric; 4 — oxalat de calciu.

### Metoda orientativă

Calculul mojarat +  $H_2O$  +  $HCl$  se încălzește la fierbere

centrifugare

Se dizolvă: — carbonați  
 — fosfați  
 — oxalați

Pentru identificare la supernatant se adaugă:  $NH_4OH$

nu precipită: carbonat

$NH_4OH$

precipită: fosfați, oxalați;  
 pentru identificarea acestora se adaugă:

$CH_3COOH$  concentrat

se dizolvă: fosfați nu se dizolvă: oxalați

Nu se dizolvă: — acid uric  
 — urați  
 — calciu

1) Reacția murexidului: la calculii rămași nedizolvați cu  $HCl$  se adaugă  $NaOH$  33%: culoarea albastru-violet pune în evidență prezența acidului uric și a uraților.

2) Reacția pentru calciu: la calculii rămași nedizolvați cu  $HCl$  se adaugă câteva picături de  $NO_3H$  1/20 și V/V soluție de acetat de sodiu 25% plus un exces de soluție de oxalat de amoniu. Precipitatul alb pune în evidență prezența calciului.



### Metoda precisă

O porțiune din pulberea obținută prin mojararea calculilor se dizolvă în  $\text{HNO}_3$ . În această soluție se identifică:

1. **Acidul uric, urații:** reacția murexidului: într-o capsulă se pun 2—5 ml din soluție. Se evaporă la flacără, se răcește. Se adaugă pe marginea capsulei o picătură de  $\text{NaOH}$  33%. Dacă apare o colorație violet intens = acid uric, urați. În partea opusă a capsulei se pune o picătură de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrat. Dacă apare o colorație purpurie se confirmă tot prezența acidului uric și uraților.

2. **Fosfații:** într-un balon cu 2—5 ml soluție se adaugă 3 ml reactiv molibdenic care conține:

molibdat de amoniu ..... 1,5 g  
apă distilată ..... 100 ml  
 $\text{HNO}_3$  concentrat ..... 100 ml

Se încălzește ușor, precipitatul galben indicind prezența fosforului.

3. **Oxalații:** la 2—5 ml soluție se adaugă exces de acetat de sodiu 25%, precipitatul alb indicind prezența oxalaților.

4. **Calciul:** într-un balon se pun 2—5 ml din soluție. Se adaugă soluția de acetat de sodiu 25%, se încălzește până la fierbere și se adaugă apoi un exces de soluții de amoniu. În prezența calciului se obține un precipitat.

## NUMĂRĂTOAREA ELEMENTELOR PATOLOGICE DIN URINĂ

### 1) Metoda Addis

Metoda se folosește pentru numărătoarea elementelor patologice urinare și se execută pe urina din 12—24 ore.

Bolnavul va reduce 24 ore cantitatea de lichide ingerate, regimul alimentar rămânând același.

Recoltarea urinei se face între orele 8—20 și 20—8 a doua zi. Se măsoară volumul urinei de zi și de noapte.

### Modul de lucru:

În două eprubete de centrifugă gradate se pipetează:

urina din probă de dimineață ..... 10 ml  
urina din proba de noapte ..... 10 ml

Se centrifughează 10 minute la 1500 ture/minut.

La persoanele normale, sedimentul este de 0,2 ml, la cei cu afecțiuni renale poate fi mai mare.

Se decantează supernatantul lăsând un volum de 1 ml.

Se omogenizează și cu o pipetă Pasteur se scoate o picătură care este introdusă în celula de numărat.

Pentru sedimentele bogate se folosește lama Bürker, pentru cele sărace lama Fuchs-Rosenthal.

După 5—10 minute de repaus se face numărătoarea.

Cilindrii se numără cu obiectivul  $10 \times$  pe întreaga suprafață a celulei ( $9 \text{ mm}^2$ ).

Eritrocitele și leucocitele se numără cu obiectivul  $40 \times 60$  pe o suprafață de  $1 \text{ mm}^2$ .

Calcul:

$$\text{numărul hematiilor din 10 ml urină} = 180 \times \frac{1}{0,0009} = 200\,000$$

0,0009 = volumul camerei de numărare

180 = hematii numărate

$$\frac{200\,000}{10} \times 200 = 4\,000\,000$$

Formula generală pentru calcularea hematiilor eliminate în 12 ore este:

$$\text{nr. hematiilor eliminate în 12 ore} = \frac{\text{Volum în ml (la care s-a redus urina)}}{\text{Volum în ml (în care s-a făcut numărătoarea)}} \times \frac{\text{Volumul urinii din 12 ore}}{10 \text{ ml}}$$

În urinile din 24 ore, mai ales în infecții se distrug cilindrii, se deformează hematiile, germeii se multiplică, sînt fagocitați de leucocite.

## 2) Metoda Hamburger

Este o metodă rapidă la care numărătoarea elementelor patologice se face pe minut și pe urină proaspăt emisă.

*Modul de lucru:*

Prima emisie de urină se aruncă. Bolnavul stă culcat la pat și apoi se recoltează urina timp de 3 ore.

Din volumul de urină emis se centrifughează 10 ml la 2000 ture/minut. Cu o pipetă Pasteur se ia o picătură și se pune pe lama Bürker, din sedimentul care a fost omogenizat în volum final de 1 ml.

Se numără 4 cimpuri de 1 mm<sup>2</sup> și se face media între ele.

Se ține seama de numărul de elemente eliminate pe ml de urină și de debitul urinar pe minut.

Dacă bolnavul a emis în 180 minute 120 ml urină, din care s-au centrifugat 10 ml, iar sedimentul s-a omogenizat în 1 ml volum final, numărătoarea pe celula Bürker se calculează:

|                   |       |            |
|-------------------|-------|------------|
| 1 mm <sup>2</sup> | ..... | 2 elemente |
| 1 mm <sup>2</sup> | ..... | 1 element  |

Media este de 1,5 elemente.

Numărul de elemente eliminate pe ml urină  $\times 1000$ :

$$1000 \times 1,5 = 1500 \text{ hematii/ml urină.}$$

$$\text{Diureză/minut} = 120 : 180 = 0,66 \text{ ml.}$$

$$\text{Hematii eliminate} = 1500 \times 0,66 = 990 \text{ elemente.}$$

Valori normale:

— Numărul de elemente figurate urinare calculate prin metoda Addis este: la adult în 24 ore se elimină:

eritrocite pînă la 500 000

leucocite între 1 000 000 și 1 800 000

cilindri pînă la 5 000

La copii în 24 ore se elimină:

eritrocite pînă la 450 000

leucocite între 9 000 — 720 000

cilindri 0 — 6 500



— Pentru metoda Hamburger:

cilindri 1—2 pînă la 7 elemente pe minut

eritrocite 110 la 1000, cifra crește în stări febrile și la femei în perioada menstruației.

*Variații patologice (metoda Addis):*

În glomerulonefrita acută:

hematii 200 000 — 2 000 000

Glomerulonefrita cu albuminurie latentă:

hematii 500 — 40 000

cilindri 400 — 600/minut

Sindromul nefrotic:

hematii 4000 — 80 000, în medie 27 000

amiloidoza renală: 7 500 elemente/minut.

Metoda Hamburger: în pielonefrite, pielocistite, tuberculoza renală, numărul leucocitelor eliminate/minut ajută la controlul evoluției bolii.

În general pentru ca numărătoarea să aibă o valoare clinică reală se cere:

— repetarea examenului de urină la intervale regulate iar determinarea cantitativă să fie cît mai exactă;

— în aprecierea unui sindrom renal să se țină seama în afară de existența hematiilor și a leucocitelor și de existența cilindrilor;

— să se coroboreze datele de laborator cu cele clinice.

## CAPITOLUL VIII

### SUBSTANȚE ANORGANICE ÎN URINĂ ȘI ÎN SÎNGE

#### DETERMINAREA SUBSTANȚELOR ANORGANICE ÎN URINĂ

##### REZIDUUL TOTAL

Se evaporă un anumit volum de urină la baia de apă pînă la consistența păstoasă. Se usucă la  $100^{\circ}$  — timp de 2—3 ore. Se lasă la exicator cu  $H_2SO_4$  pînă la răcire. Se cîntărește, iar cifra obținută reprezintă reziduul total sau extractul sec și se raportează la cantitatea de urină din 24 ore.

*Valori normale la adult:*

Reziduul total: 40—65 g pentru urina din 24 ore.

Aceste cantități scad după 50 de ani.

##### DOZAREA CLORURILOR

###### 1. Metoda Volhard

*Principiu:* clorul este precipitat cu azotat de argint, iar excesul este titrat cu sulfocianură de amoniu în prezența unui indicator.

*Reactivi:* 1) nitrat de argint 0,1 N

|                        |          |
|------------------------|----------|
| nitrat de argint ..... | 16,989 g |
| apă distilată .....    | 500 ml   |
| acid azotic 50% .....  | 500 ml   |

2) Indicator:

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| alaun feri-amoniacal          |        |
| alaun de fier și amoniu ..... | 5 g    |
| apă .....                     | 100 ml |

3) Sulfocianură de amoniu 0,1 N

|                      |        |
|----------------------|--------|
| sulfocianură K ..... | 0,97 g |
| apă .....            | 100 ml |



**Modul de lucru:** într-un balon de 100 ml se pipetează:

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| — urină .....            | 5 ml  |
| — apă distilată .....    | 10 ml |
| — nitrat de argint ..... | 10 ml |
| — alaun feric .....      | 5 ml  |

Amestecul este titrat cu o soluție de sulfocianură de amoniu pînă la apariția unei colorații persistente galben-roșiatice.

**Calcul:**

1 ml  $\text{AgNO}_3$  0,1 N corespunde la 5,85 mg NaCl sau 3,55 mg Cl.

$$(10-n) \times 200 \times 5,85 \text{ g NaCl}\%_{\text{ml}} = \text{urină}$$

$$(10-n) \times 200 \times 3,55 \text{ g Cl}\%_{\text{ml}} = \text{urină}$$

n = cantitatea de sulfocianură de amoniu folosită la titrare.

Rezultatele obținute în mg sînt transformate în grame și raportate la cantitatea din 24 ore.

$$\text{mg NaCl}\% = \text{nr.ml AgNO}_3 \text{ folosiți la titrare } 5,85 \times 10$$

## 2. Metoda Mohr

**Principiu:** clorul din urină este precipitat cu  $\text{AgNO}_3$  sub formă de clorură de argint insolubilă.

**Reactivi:**

- Soluție de  $\text{AgNO}_3$  0,1 N
- Soluție  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  7 g% (indicator)

**Modul de lucru:**

Într-o eprubetă se pipetează:

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| urină .....     | 1 ml          |
| apă .....       | 10 ml         |
| indicator ..... | 2—3 picături. |

Se titrează cu  $\text{AgNO}_3$  0,1 N în prezență de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  pînă la apariția culorii roșu cărămiziu.

**Calcul:**

1 ml soluție  $\text{AgNO}_3$  0,1 N · 5,846 mg NaCl

$$\text{mg NaCl}\% = \text{nr.ml AgNO}_3 \text{ folosiți la titrare } \times 5,846 \times 10$$

Pentru a exprima în Cl-mg% rezultatul obținut se înmulțește cu 0,6066.

Valori normale:

$$10 - 12 \text{ g NaCl}\%_{\text{ml}} \text{ sau } 120 - 200 \text{ mEq}\%_{\text{ml}}$$

Eliminarea clorurilor depinde în primul rînd de alimentație. În mod normal, în 24 ore se elimină 10—15 g cloruri. După cîteva zile de regim fără sare, eliminarea clorurilor poate scădea pînă la 1 g/24 ore. De asemenea ea scade și prin retenția de cloruri în: exsudate, transsudate, edeme, precum și în nefrită, unele boli febrile (pneumonie, tifos), ocluzie intestinală etc. Eliminarea clorurilor crește în regimul hiperclorurat, poliurie etc.

## DOZAREA SODIULUI ȘI POTASIULUI

Sodiul și potasiul se dozează după tehnicile descrise la analiza singelui, folosind urină filtrată și lipsită de albumină. Dacă este necesar se va dilua în prealabil urina cu apă distilată într-o proporție convenabilă.

## DOZAREA FOSFORULUI ANORGANIC

### Metoda Briggs

Ionul fosforic cu molibdatul de amoniu în mediu acid formează acidul fosfomolibdenic care în prezența hidrochinonei (reducător) dă o culoare albastră a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de fosfor.

**Reactivi:** 1. — acid molibdenic:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| — molibdat de amoniu .....   | 25 g   |
| — $H_2SO_4$ (D = 1,84) ..... | 75 g   |
| — apă distilată .....        | 500 ml |

2. — hidrochinonă:

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| — hidrochinonă .....         | 20 g     |
| — $H_2SO_4$ (D = 1,84) ..... | 1 ml     |
| — apă distilată .....        | 1 000 ml |

3. — carbonat-sulfit:

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| a) — sulfite de sodiu .....  | 75 g     |
| — apă distilată .....        | 500 ml   |
| b) — carbonat de sodiu ..... | 400 ml   |
| — apă distilată .....        | 2 000 ml |

se amestecă soluția a cu soluția b

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| 4. — bisulfite de sodiu ..... | 7 g   |
| — apă distilată .....         | 10 ml |

**Modul de lucru:** se pipetează într-un balon cotat de 100 ml:

|                      | Probă  |
|----------------------|--------|
| — apă distilată      | 20 ml  |
| — urină              | 0,1 ml |
| — bisulfite de sodiu | 5 ml   |
| — acid molibdenic    | 5 ml   |
| — hidrochinonă       | 5 ml   |

După 5 minute se adaugă 32 ml carbonat sulfite și se completează pînă la 100 ml cu apă distilată. Se agită, se citește la  $\lambda = 600$  m $\mu$  față de apă, cuva 1 cm.

**Calcul:**  $\text{mg}\% \text{ fosfor anorganic} = E \times F$

E = extincția

F = fosfor = 508

**Observații:** fosforul se dozează în urinale limpezi. Cînd sint tulburi se acidulează sau se alcalinizează în funcție de natura precipitatului. Urinale cu albumină se tratează cu acid tricloracetice 20% V/V, la cald, se răcesc la curent de apă și se centrifughează.

**Valori normale:**

2—4 g‰ ml urină exprimată în  $P_2O_5$ .

Pentru exprimarea în acid ortofosforic se înmulțește valoarea cu 14.

## DOZAREA CALCIULUI

### Metoda Wood

**Principiu:** calciul în prezența oxalatului de amoniu precipită sub forma de oxalat de calciu. Precipitatul este solubil în acizi formînd acidul oxalic care poate fi titrat cu  $KMnO_4$  0,01 N.



**Reactivi:** — soluție saturată de oxalat de amoniu (4 g%)

|                   |       |
|-------------------|-------|
| — amoniac .....   | 2%    |
| — $H_2SO_4$ ..... | N/1   |
| — $KMnO_4$ .....  | N/100 |

**Modul de lucru:** se pipetează în două eprubete:

|                   | Probă | Martor |
|-------------------|-------|--------|
| urină diluată 1/5 | 2 ml  | —      |
| $H_2O$            | 2 ml  | 4 ml   |
| oxalat amoniu     | 1 ml  | 1 ml   |
| soluție saturată  |       |        |

Repaus 24 ore și centrifugare la 3 000 ture/minut 10 minute, decantare. Peste precipitat se adaugă amoniac 2%, 5 ml de 2—3 ori pentru spălare. Precipitatul se dizolvă în  $H_2SO_4$  N/1, pe baie de apă la 60—70°. Soluția caldă se titrează cu  $KMnO_4$  N/100 până la culoarea roz ce persistă 30 secunde.

**Calcul:**

1 ml  $KMnO_4$  0,01 N = 0,2 mg Ca  
 $mg\ Ca\% = (n - n') \times 0,2 \times 250 = (n - n') \times 50$   
 $n = ml\ KMnO_4\ 0,01\ N$  folosiți la titrarea probei  
 $n' = ml\ KMnO_4\ 0,01\ N$  folosiți la titrarea martorului.

**Valori normale:**

mg Ca în urina din 24 ore = 70—300

## DOZAREA CALCIULUI ȘI MAGNEZIULUI

### Metoda complexometrică

**Principiu:** ionii de Ca și Mg formează complexe stabile cu EDTA denumite comercial complexon III. În urina totală se dozează Ca și Mg. Paralel se face o altă probă pentru Mg cu urină, din care Ca a fost precipitat cu oxalat de amoniu. Prin diferență se obține cantitatea de Ca.

**Reactivi:**

1. Soluție EDTA 0,186 g %

2. Soluție indicator roșu de metil 0,030 g % ml

În momentul întrebuițării se diluează 1/20 în alcool 70°.

3. Soluție alcoolică ericrom T

|                 |         |
|-----------------|---------|
| ericrom T ..... | 0,103 g |
| apă .....       | 100 ml  |

În momentul întrebuițării se diluează 1/20 în alcool 76°.

4. Soluție oxalat de sodiu

|                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| oxalat de sodiu .....                | 6,7 g        |
| apă bidistilată .....                | 500 ml       |
| roșu metil .....                     | 2—3 picături |
| acid acetic 10% până la culoarea roz |              |
| apă bidistilată .....                | 1 000 ml     |

5. Soluție tampon pH = 10,8

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| acid sulfamic .....   | 1 g    |
| piperazină .....      | 23 g   |
| apă bidistilată ..... | 100 ml |

6. Soluție etalon calciu 100 mg‰  
 $\text{CaCO}_3$  ..... 0,250  
HCl concentrat pînă la dizolvare  
apă bidistilată ..... 1 000 ml
7. Acid acetic 10%
8. Soluție tampon sulfamat de amoniu  
sulfamat de amoniu ..... 0,8 g  
apă bidistilată ..... 20 ml  
amoniac pînă la ..... 100 ml

*Modul de lucru:* în balon cotate de 25 ml se pipetează:

|                       |                      |
|-----------------------|----------------------|
| urină .....           | 5 ml                 |
| roșu metil .....      | 2 picături           |
| acid acetic 10% ..... | pînă la culoarea roz |
| apă .....             | pînă la 25 ml        |

Din această urină se pipetează într-o eprubetă de centrifugă

|                         |      |
|-------------------------|------|
| urina diluată 1/5 ..... | 2 ml |
| oxalat de sodiu .....   | 2 ml |

Se lasă în repaus 1 oră și apoi se centrifughează la 2 000—3 000 de rotații pe minut. Se folosește supernatantul pentru determinarea magneziului. În pahare Berzelius de 50 ml se pipetează:

|                           | A<br>(Ca + Mg) | B<br>(Mg) | C<br>(Etalon) |
|---------------------------|----------------|-----------|---------------|
| Urină diluată 1/5         | 1 ml           | —         | —             |
| supernatantul             | —              | 2 ml      | —             |
| etalon calciu             | —              | —         | 0,5 ml        |
| roșu de metil diluat 1/20 | 1 ml           | 1 ml      | 1 ml          |
| tampon                    | 0,5 ml         | 0,5 ml    | 0,5 ml        |

se titrează cu EDTA pînă la viraj verde, se notează:

$N$  = ml EDTA necesari pentru proba A (Ca + Mg)  
 $N'$  = ml " " " " B (Mg)  
 $n$  = ml " " " " C (etalon)

*Calcul:*

$N - N' = \text{ml EDTA necesari pentru calciu}$

$$\text{mg Ca} \%_{00} \text{ ml urină} = \frac{N - N'}{n} = 0,05 \times 5 \times 1\,000$$

dacă 1 mol Ca (40) ..... 1 mol Mg (24)

0,05 mg Ca ..... x

$x = 0,03 \text{ mg magneziu corespunzător cantității de calciu din proba etalon}$

$$\text{Mg mg} \%_{00} \text{ ml urină} = N'/N \times 0,03 \times 5 \times 1\,000.$$

*Valori normale:*

— calciu = 0,15 — 0,20 g Ca/24 ore (5 — 10 mEq/24 ore)

— magneziu = 0,05 — 0,1 g Mg/24 ore (2—5 mEq/24 ore)

*Observații:* dacă urina conține depozit de oxalat de calciu și magneziu acesta este dizolvat cu o cantitate minimă de HCl N, după care urina se filtrează.



## DOZAREA SULFULUI

În urină sulful se găsește sub 3 forme: sulf anorganic sub formă de sulfați, derivați sulfoconjugați și sulf organic în aminoacizi ca: cistină, cisteină metionină.

### DOZAREA SULFULUI ANORGANIC

Sulfații în prezența benzidinei dau sulfați de benzidină care la fierbere se descompun în benzidină și acid sulfuric. Acidul sulfuric este titrat cu NaOH.

*Reactivi:* 1. Soluție benzidină

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| benzidină .....       | 2 g      |
| HCl concentrat.....   | 2,5 ml   |
| H <sub>2</sub> O..... | 1 000 ml |

2. Soluție apoasă de  $\alpha$ -dinitrofenol 0,05 g% ml apă

3. Fenolftaleină indicator

4. NaOH ..... 0,1 N

5. HCl ..... 0,1 N

*Modul de lucru:* se pipetează într-o eprubetă de centrifugă:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| urină .....                  | 2 ml   |
| soluție benzidină .....      | 10 ml  |
| $\alpha$ -dinitrofenol ..... | 0,2 ml |

Acest amestec se titrează cu HCl 0,1 N pînă la dispariția culorii galbene. Se agită, se lasă în repaus 10', se centrifughează la 3000 t/minut. Se reia precipitatul în 5 ml apă și se adaugă 2 picături de fenolftaleină. Se încălzește la fierbere cîteva minute. Se titrează cu NaOH N/10 pînă la culoarea roz.

*Calcul:* 1 ml NaOH 0,1 N = 0,004 g sulfați

g sulfați ‰ =  $n \times 0,004 \times 500$

$n$  = ml NaOH 0,1 N utilizați la titrare.

*Valori normale:* sulf anorganic 554 mg în urina din 24 ore.

*Valori crescute:* în intoxicații cu benzină sau derivații anilinei, în distrugerii de proteină, în TBC intestinal, peritonită.

## DETERMINAREA SUBSTANȚELOR ANORGANICE ÎN SÎNGE

### DOZAREA CLORULUI ÎN SÎNGE

#### 1) Metoda Mohr

*Principiu:* același ca la dozarea NaCl.

Clorul din ser este precipitat cu  $\text{AgNO}_3$  sub formă de clorură de argint insolubilă. Cînd întreaga cantitate de clor a fost consumată, prima picătură în exces de  $\text{AgNO}_3$  formează cu cromatul de potasiu, cromatul de argint.

*Reactivi:*

|                                        |       |
|----------------------------------------|-------|
| Soluție $\text{AgNO}_3$ .....          | 0,1 N |
| Soluție $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ..... | 7 %   |
| Alcool .....                           | 96°   |

*Modul de lucru:* într-un balon Erlenmayer se pipetează:

— ser ..... 1 ml  
— alcool ..... 10 ml

se agită și se filtrează. Se spală precipitatul rămas pe hirtia de filtru cu încă 5 ml alcool. Filtratului i se adaugă 0,1 ml  $K_2Cr_2O_7$ . Se face titrarea cu  $AgNO_3$  pînă la apariția culorii portocalii persistente.

*Calcul:*

nr. ml  $AgNO_3 \times 100 = \text{valoarea } Cl^- \text{ în mEq\%}$ .

## 2) Metoda O. Schales și S. Schales

**Principiu:** ionii de clor împreună cu ionii de mercur formează clorura de mercur nedisociabilă. Ionii de  $Hg^{++}$  în exces formează cu difenilcarbazona un compus de culoare violet.

*Reactivi:*

Soluție nitrat mercuric ..... 0,01 N  
1 ml = 0,355 mg Cl sau = 0,58 mg NaCl  
Soluție acid sulfuric ..... 0,2 N  
Soluție alcolică de difenilcarbazonă 0,250 g%  
Soluție etalon de acid clorhidric 0,1 N pentru control.

*Modul de lucru:* într-un balon Erlenmayer de 25 ml se pipetează:

|                         | Probă  | Etalon |
|-------------------------|--------|--------|
| apă distilată .....     | 1 ml   | 1 ml   |
| ser .....               | 0,1 ml | —      |
| soluție etalon .....    | —      | 0,1 ml |
| soluție $H_2SO_4$ ..... | 0,1 ml | 0,1 ml |
| indicator .....         | 0,2 ml | 0,2 ml |

Se agită și se titrează cu soluție de nitrat mercuric pînă la violet.

*Calcul:*

$g\ Cl\% \text{ ml ser} = \text{ml soluție nitrat mercuric utilizați} \times 3,55$

*Valori normale:*

|        |           |         |
|--------|-----------|---------|
|        | Cl g%     | NaCl g% |
| ser    | 3,34—3,76 | 5,8     |
| plasmă | 3,6       | 5,8     |

*Clor globular*

clor plasmatic 0,48—0,52

*Observații:*

Dacă serul este hemolizat sau icteric se face o defecare:

apă distilată ..... 4 ml  
ser ..... 0,5 ml  
 $H_2SO_4$  0,2 N ..... 0,25 ml  
tungstat de sodiu 10% 0,25 ml

Se agită și se centrifughează; 1 ml supernatant este egal cu 0,1 ml ser. Bromurile reacționează identic cu clorurile modificînd rezultatele.

Virajul spre violet de la începutul titrării nu trebuie luat în considerație.



## DOZAREA CLORURII DE SODIU ÎN SER

### Metoda Volhard-Charpentier

**Principiu:** clorul este precipitat cu azotat de argint după distrugerea substanțelor organice din ser prin fierbere cu permanganat de potasiu în mediu de acid azotic. Excesul de  $\text{AgNO}_3$  se titrează cu sulfocianură de amoniu în prezența alaunului feriamoniacal.

#### Reactivi:

1. —  $\text{AgNO}_3$  ..... 2,9063 g%
2. — soluție saturată de permanganat de potasiu
3. —  $\text{HNO}_3$  concentrat
4. — alaun feriamoniacal 5 g%
5. — apă oxigenată 10%
6. — soluție sulfocianură de amoniu 1,3011 g‰

#### Modul de lucru:

Într-un balon Erlenmayer se pipetează:

|                                         |              |
|-----------------------------------------|--------------|
| apă                                     | 10 ml        |
| ser, plasmă                             | 0,1 ml       |
| $\text{AgNO}_3$                         | 1 ml         |
| soluție saturată permanganat de potasiu | 0,5 ml       |
| $\text{HNO}_3$                          | 1 ml         |
| Se fierbe 10 minute                     |              |
| apă oxigenată                           | 1—2 picături |
| Răcire                                  |              |
| alaun feriamoniacal                     | 0,2 ml       |

Titrare până la viraj roz cu sulfocianură de amoniu.

#### Calcul:

$$1 \text{ ml } \text{AgNO}_3 = 1 \text{ ml } \text{NH}_4\text{SCN} = 0,001 \text{ g NaCl}$$

$$\text{g NaCl}\% = (1 - N) \times 0,001 \times 1000$$

$N$  = ml sulfocianura de amoniu folosiți la titrare. Pentru a exprima în Cl se înmulțește cantitatea de NaCl găsită cu 0,6068.

**Variații fizio-patologice.** Eliminarea clorurilor depinde în primul rând de alimentație. În mod normal, în 24 ore se elimină 10—15 g cloruri. După câteva zile de regim fără sare, eliminarea clorurilor poate scădea până la 1 g/24 ore.

Variațiile natremiei însoțesc modificările volumelor hidrice, influențând presiunea osmotică a plasmei și repartitia lichidelor în spațiul celular și extracelular.

Valori scăzute sînt întîlnite în pierderi exagerate de lichide, vărsături, diaree, arsuri, insuficiență corticosuprarenală.

Scăderea natremiei se datorește reținerii unor lichide bogate în  $\text{Na}^+$ : lichide de edem la arsuri, lichide digestive în ocluzia intestinală, lichidele pleurale și peritoneale;

— hiponatremia diluțională — hiperhidratarea globală întîlnită în insuficiența cardiacă, afecțiuni pulmonare, cerebrale;

— hiponatremia esențială observată la denutriți, cașectici, cardiaci, cirofici în stare avansată;

- hipernatremia pură, rar întâlnită fără modificări ale volumelor hidrice, în hipertensiune precoce;
- hipocloremii în regim hipoclorat, poliurie. De asemenea ea scade și prin retenția de cloruri în: exsudate, transsudate, edeme precum și în nefrită, unele boli febrile (preumonie, tifos), ocluzia intestinală etc. Eliminarea clorurilor crește în regimul hiperclorurat, poliurie etc.

### DOZAREA SODIULUI ÎN SER

*Principiu:* sodiul din ser se precipită cu reactiv magneziu uranilic sub formă de acetat triplu de sodiu, magneziu și uranil.

Precipitatul se poate cîntări sau se reia cu apă și se titrează cu NaOH.

*Reactivi:*

1. soluție acetat de magneziu și uranil:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| acetat de uranil    | 32 g   |
| acetat de magneziu  | 100 g  |
| acid acetic glacial | 20 ml  |
| alcool 96°          | 500 ml |
| apă distilată       | 300 ml |

Se încălzește și după dizolvare se aduce la 1 000 ml cu apă bidistilată. Se lasă 2—3 zile la întuneric și apoi se filtrează.

2. soluție acid tricloraetic 20 g% ml apă

3. soluție amoniac 10%

4. alcool saturat cu precipitat de sare de acetat triplu de uranil, magneziu și sodiu.

La 1 litru de alcool de 96° se adaugă precipitatul de sare triplă de la câteva dozări gravimetrice anterioare. Se filtrează.

5. soluție NaOH N/10

6. soluție indicator fenolftaleină

*Modul de lucru:*

|                           |      |
|---------------------------|------|
| ser                       | 2 ml |
| apă                       | 6 ml |
| soluție acid tricloraetic | 2 ml |

Agitare. Filtrare

|                                                  |         |
|--------------------------------------------------|---------|
| filtrat                                          | 2,5 ml  |
| fenolftaleină                                    | 0,05 ml |
| amoniac pînă la viraj roz acetat de Mg și uranil | 10 ml   |
| alcool saturat                                   | 0,1 ml  |

Repaus 1 oră. Centrifugare.

|                                           |         |
|-------------------------------------------|---------|
| Peste precipitat se adaugă alcool saturat | 5—10 ml |
|-------------------------------------------|---------|

Se centrifughează, se decantează și se repetă operația de 2—3 ori.

Se reia cu 20 ml apă distilată în pahar Berzelius. Se adaugă o picătură soluție fenolftaleină și se titrează cu NaOH pînă la viraj roz-pal.

*Calcul:*

$$g \text{ Na}\% \text{ ml ser} = N \times 0,0002875 \times 2000$$

N = numărul ml de NaOH folosiți pentru titrare

1 ml NaOH N/10 conține 0,004 g NaOH.



Din reacție rezultă că la o moleculă de sare triplă (23 g Na) corespund 8 molecule de NaOH ( $8 \times 40$  NaOH) adică:

$$\begin{array}{lcl} 23 \text{ g Na} & \dots\dots\dots & 8 \times 40 \text{ g NaOH} \\ x & \dots\dots\dots & 0,004 \text{ g NaOH} \\ & & x = 0,002875. \end{array}$$

Valori normale:

ser 3,24 g Na‰ ml sau 140 mEq/l

urină 4–8 g Na‰ ml sau 120–200 mEq/l

## DOZAREA POTASIULUI ÎN SER

### Metoda Kramer-Tisdall

*Principiu:* potasiul din ser este precipitat cu cobaltonitrat de sodiu sub formă de cobalt nitrit de sodiu și potasiu.

Prin adăugarea în exces de permanganat de potasiu, grupa nitrit a complexului este oxidată la grupa nitrat. Surplusul de permanganat de potasiu este apoi titrat cu acid oxalic.

*Reactivi:*

— reactiv nitrocobaltic:

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| soluția A) nitrit de sodiu.....   | 120 g   |
| apă distilată .....               | 180 ml  |
| soluția B) nitrat de cobalt ..... | 25 ml   |
| apă distilată .....               | 50 ml   |
| acid acetic glacial .....         | 12,5 ml |

La soluția B se adaugă 210 ml din soluția A. Se trece apoi un curent de aer prin soluție pentru a îndepărta vaporii nitroși. Înaintea fiecărei titrări se va trece un curent de aer prin soluție.

— Soluție permanganat de potasiu 0,1 N

— Soluție  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%

— Soluție acid oxalic 0,1 N

*Modul de lucru:*

Într-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

ser nehemolizat ..... 1 ml

reactiv nitrocobaltic ..... 2 ml

(picătură cu picătură)

Repaus 45 minute. Centrifugare 30 minute la 3 000 t. Precipitatul este spălat cu:  
apă ..... 20 ml

Se repetă operația de spălare de 3 ori. Peste precipitat se adaugă:  
permanganat de potasiu ..... 4 ml

$\text{H}_2\text{SO}_4$ ..... 1 ml

Încălzire 30 secunde la baie de apă.

Dacă soluția se decolorează, se mai adaugă 1 ml permanganat de potasiu, se amestecă cu o baghetă și se pune la baie de apă timp de 1–5 minute.

soluție acid oxalic ..... 2 ml

Surplusul de acid oxalic se titrează cu permanganat de potasiu.

### Calcul:

$g\ K\ \% \text{ ml ser} = (N - 2) \times 0,071$

1 ml  $KMnO_4$  0,1 N = 0,071 mg K

N = numărul de ml  $KMnO_4$  utilizați la titrare

N - 2 (ml acid oxalic) = numărul de ml  $KMnO_4$  consumați de cobalto-nitritul de sodiu și potasiu.

### Valori normale:

Plasmă 0,16 — 0,22 g K  $\%$  sau 4 — 5,5 mEq/l

Globule 34 — 59,5 g K  $\%$  sau 134—248 mEq/l

Urină 1 — 4 g K  $\%$  sau 40—50 mEq/l

## DOZAREA CALCIULUI ÎN SER

### 1) Metoda Wood

**Principiu:** calciul este precipitat sub formă de oxalat de calciu care este solubil în acid azotic concentrat. Prin solubilizare se eliberează acidul oxalic care se titrează cu o soluție de permanganat de potasiu.

**Reactivi:** soluție saturată de oxalat de amoniu (4 g%)

soluție permanganat de potasiu 0,1 N

acid azotic concentrat

amoniac 2%

**Modul de lucru:** într-un tub de centrifugă se pipetează:

|                                   | Probă | Martor |
|-----------------------------------|-------|--------|
| ser                               | 2 ml  | —      |
| apă                               | 2 ml  | 4 ml   |
| soluție saturată oxalat de amoniu | 1 ml  | 1 ml   |

După 2 ore se centrifughează

Precipitatul este spălat de 3 ori cu amoniac 2%.

Peste precipitat se adaugă:

acid azotic

0,5 ml

0,5 ml

Încălzire la 70—75°C.

Titrare se face la cald cu o soluție de permanganat de K N/100 până la culoarea roz, care trebuie să persiste 30".

### Calcul:

1 ml soluție permanganat de potasiu N/100 corespunde la 0,2 mg calciu.

mg calciu  $\%$  ml ser =  $N \times 0,2 \times 50 = N \times 10$

$N = n_1 - n_2$

$n_1$  = numărul ml întrebuițați la titrarea probei.

$n_2$  = numărul ml întrebuițați la titrarea matorului

rezultă : mEq calciu/litru =  $N \times 10$ .

### 2. Metoda cu EDTA

**Principiu:** calciul din ser se titrează cu etilen-diamină-tetra-acetat disodic (EDTA-di Na) utilizând purpuratul de amoniu (murexid) ca indicator.



### Reactivi:

1. — etilendiamină-tetraacetat de sodiu ..... 0,001 N  
EDTA de  $\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ..... 1900 mg  
apă ..... 1 000 ml

2. — Standard de calciu (stock):

a) carbonat de calciu anhidru... 100 mg

b) acid clorhidric  $d = 1,19$  ..... 0,2 ml

Se pun în capsulă la evaporat.

Se reia cantitativ și se trece în balon cotat de 50 ml.

Conține 0,8 mg Ca/ml.

În momentul întrebuintării se diluează 1/10 cu apă și conține 0,08 mg Ca/ml.

3. — Hidroxid de sodiu: 36 g/100 ml apă

4. — Indicator: 50 mg murexid/5 ml apă.

Se prepară zilnic.

Etalonarea soluției EDTA:

|                                   | Probă  | Martor |
|-----------------------------------|--------|--------|
| standard de lucru (0,08 mg Ca/ml) | 25 ml  | —      |
| $\text{H}_2\text{O}$              | 25 ml  | 50 ml  |
| $\text{NaOH}$ 9 N                 | 0,2 ml | 0,2 ml |
| indicator murexid                 | 0,1 ml | 0,1 ml |

Se titrează cu EDTA proba până la identitate de culoare cu martorul. 25 ml standard se titrează cu 10 ml EDTA. Se ajustează soluția de EDTA dacă diferă valorile încît:

1 ml EDTA să corespundă la 0,2 mg Ca.

Modul de lucru:

În două eprubete se pipetează:

|                  | Probă   | Martor  |
|------------------|---------|---------|
| ser              | 1 ml    | —       |
| apă              | 50 ml   | 51 ml   |
| $\text{NaOH}$ 9N | 0,2 ml  | 0,2 ml  |
| indicator        | 0,05 ml | 0,05 ml |

Se titrează cu EDTA proba până la identitate de culoare cu martorul.

Calcul:

$\text{mg Ca}/100 \text{ ml ser} = \text{ml EDTA consumați la titrare} \times 20$  sau dacă s-a stabilit factor de titrare:

$\text{mg Ca}/100 \text{ ml ser} = \text{ml EDTA consumați la titrare} \times F \times 20$

Valori normale în ser:

copii: 10—12 mg/100 ml

5—6 mEq/litru

adulți: 9—11 mg/100 ml

4,5—5,5 mEq/litru

## IONOGRAMA

### DOZAREA Cl, Na, K, Ca

Pentru efectuarea ionogramei se folosește aparatul „fotometrul cu flacără tip Zeiss“.

Descrierea și funcționarea aparatului sînt date în instrucțiunile ce însoțesc aparatul respectiv.

Metoda de analiză cantitativă care permite determinarea concentrației metalelor alcaline și alcalino-pămîntoase dintr-o soluție cu ajutorul fotometrului cu flacără se numește flamfotometrie.

*Principiu:* concentrația ionilor cercetați este proporțională cu fluxul luminos a cărui intensitate se determină prin măsurarea curentului electric cu ajutorul unui galvanometru.

Probele de analizat se amestecă cu un gaz carburant și ard într-un bec special, luînd naștere spectre de emisie caracteristice fiecărui element.

#### *Stabilirea curbei etalon:*

Pentru ca soluția etalon să aibă aceeași compoziție și concentrație cu a singelui, se face o singură soluție etalon:

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| NaCl .....              | 8,2848 g‰ |
| KCl .....               | 0,3700 g‰ |
| CaCO <sub>3</sub> ..... | 0,250 g‰  |

Din soluția etalon se fac diluțiile 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, cu apă bidistilată, corespunzătoare la:

|      |    |     |     |                         |
|------|----|-----|-----|-------------------------|
| 35,5 | 71 | 142 | 213 | 284 mEq/l pentru Na     |
| 1,25 | 25 | 5   | 7,5 | 10 mEq/l pentru K și Ca |

Se înscriu concentrațiile pe abscisă iar intensitatea curentului galvanometrului pe ordonată și se trasează curbele.

Pentru Na<sup>+</sup> se obține o curbă, iar pentru K<sup>+</sup> și Ca<sup>++</sup> se obțin drepte.

#### *Pregătirea probelor:*

|                               |       |
|-------------------------------|-------|
| ser, plasmă, urină, LCR ..... | 1 ml  |
| apă bidistilată .....         | 50 ml |

Rezultatul se citește pe curbă în mEq/l.

#### *Avantajele metodei:*

- rapiditatea care reprezintă o superioritate față de celelalte determinări chimice;
- limita de eroare corespunde analizelor chimice;
- consumul minim de substanțe reprezintă un avantaj deosebit pentru clinică.

### DOZAREA MAGNEZIULUI ÎN SER

*Principiu:* ionul Mg<sup>++</sup> formează un complex colorat în roșu cu colorantul organic „galben titan“ (galben de tiazol). Pentru stabilizarea culorii se adaugă o soluție macromoleculară: gumă arabică sau alcool polivinilic.



### Reactivi:

- acid tricloracetic soluție 20%
- soluție de gumă arabică sau alcool polivinilic 0,1% în apă (stabilizator)
- galben titan soluție 0,05 % în apă
- hidroxid de sodiu 4N, 16%
- standard stock care conține 1 mg Mg/ml:

sulfat de magneziu  $7H_2O$  .... 1,0135 g

acid sulfuric 0,1 N ..... 100 ml.

În momentul întrebuițării se diluează 1 ml standard la 100 ml apă. Conține 1 mgMg/100.

*Modul de lucru:* într-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

|                    | Probă | Blanc | Standard |
|--------------------|-------|-------|----------|
| apă                | 2 ml  | —     | —        |
| ser                | 1 ml  | —     | —        |
| acid tricloracetic | 1 ml  | —     | —        |

Se agită și după 10 minute se centrifughează

|                   |        |        |        |
|-------------------|--------|--------|--------|
| supernatant ser   | 2 ml   | —      | —      |
| standard de lucru | —      | —      | 1 ml   |
| apă               | —      | 2 ml   | 1 ml   |
| stabilizator      | 1 ml   | 1 ml   | 1 ml   |
| galben titan      | 0,5 ml | 0,5 ml | 0,5 ml |
| hidroxid de sodiu | 1 ml   | 1 ml   | 1 ml   |

Se amestecă și se lasă 30 minute la temperatura camerei.

Se măsoară extincția probelor și a standardului la  $\lambda = 560 \text{ m}\mu$  în cuva de 1 cm față de blanc.

### Calcul:

Standard = 1 mg Mg/100

Cei 2 ml supernatant reprezintă 0,5 ml ser.

$$\text{mg Mg}^{++} / 100 \text{ ml ser} = \frac{E_p}{E_s} \times 2$$

$$\text{sau mEq Mg}^{++} / \text{litru ser} = \frac{E_p}{E_s} \times 1,62$$

### Valori normale:

Adulți: 1,5—3,5 mg/100 ml ser sau

1,25—2,9 mEq/l

Copii pînă la 10 ani:

1,6—2,4 mg/100 ml ser sau

1,3—2,0 mEq/l

Aceste valori sînt utilizate în diagnosticul tulburărilor de calcificare, tetanie, sindroame neuropsihice.

## DETERMINAREA FIERULUI SERIC

### 1) Metoda Heilmeyer-Ploetner

**Principiu:** sărurile feroase dau cu ortofenantrolina un complex roșu foarte stabil, format din 3 molecule de ortofenantrolină pentru un atom de fier feros. Intensitatea culorii este proporțională cu cantitatea de fier.

**Reactivi:**

- acid clorhidric 6N
- acid tricloracetic 20%
- paranitrofenol 1% în alcool de 96°
- amoniac 20%
- acid sulfuric 0,5 N
- hidrochinonă 2% (se face în ziua întrebuintării)
- clorhidrat de ortofenantrolină 1% în apă distilată, acidulată cu 2—3

picături de acid sulfuric

— soluție stoc: alaun feriamoniacal 0,0863 g  $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}]$  dizolvat în 50 ml HCl 6N. Din această soluție se face o diluție 1% : 1 ml = = 2γ fier. Soluția servește la construirea curbei etalon care se efectuează cu cel puțin 3 diluții ale acestei soluții.

**Modul de lucru:**

|                                                         | Probă   | Martor  |
|---------------------------------------------------------|---------|---------|
| ser                                                     | 2 ml    | —       |
| acid clorhidric 6N                                      | 1 ml    | —       |
| Agitare, 10 minute repaus.                              |         |         |
| acid tricloracetic 20%                                  | 2 ml    | —       |
| Agitare, 10 minute repaus. Filtrare sau centrifugare    |         |         |
| filtrat                                                 | 2,5 ml  | —       |
| apă                                                     | —       | 2,5 ml  |
| p-nitrofenol                                            | 0,05 ml | 0,05 ml |
| amoniac până la neutralizare = culoarea galbenă         |         |         |
| acid sulfuric 0,5 N până la dispariția culorii galbene. |         |         |
| hidrochinonă                                            | 0,5 ml  | 0,5 ml  |
| ortofenantrolină                                        | 0,5 ml  | 0,5 ml  |
| apă până la 5 ml volum final.                           |         |         |

După 10 minute se citește extincția probei față de martor la  $\lambda = 510 \text{ m}\mu$  la fotocolorimetru (filtru verde) și se face interpolarea în curba etalon.

Se poate folosi și un factor de pantă care a fost scos din curba obținută cu cele trei diluții ale soluției stoc.

$$\text{Fier } \% \text{ ml} = (\text{Ep} - \text{Em}) \times K$$

unde  $\text{Ep}$  = extincția probei

$\text{Em}$  = extincția martorului

$K$  = factor

### 2) Metoda standardizată

**Principiu:** în prezența fenantrolinelor (orto- sau betafenantrolină) fierul bivalent formează un complex colorat. Intensitatea culorii este proporțională cu cantitatea de fier.



### Reactivi:

— soluție pentru deproteinizare:

|                      |        |
|----------------------|--------|
| acid tricloracetic   | 25 g   |
| acid tioglicolic 80% | 7,5 ml |
| acid clorhidric 2N   | 200 ml |

Substanțele se aduc la volum final de 250 ml cu acid clorhidric 2N.

— soluție fenantrolină:

|                    |        |
|--------------------|--------|
| ortofenantrolină   | 500 mg |
| acetat de sodiu 2N | 250 ml |

— soluție stock fier metalic:

|                    |       |
|--------------------|-------|
| fier metalic p.a.  | 50 mg |
| acid clorhidric 7N | 1 ml  |

Se amestecă ingredientele și se pun pe baie de apă la fierbere. După răcire se completează cu apă până la 100 ml.

Această soluție conține:

$$1 \text{ ml} = 500/\mu\text{gFe}.$$

În momentul întrebuițării se diluează 1/250 cu acid clorhidric 5mM.

1 ml din această diluție conține 2 mg Fe

Modul de lucru: în 3 eprubete se pipetează:

|                               | Probă | Martor | Standard |
|-------------------------------|-------|--------|----------|
| ser                           | 2 ml  | —      | —        |
| soluție stock de lucru        | —     | —      | 2 ml     |
| soluție pentru deproteinizare | 2 ml  | 2 ml   | 2 ml     |

Se amestecă, se lasă în repaus 5 minute și se centrifughează 10 minute la 3 000 t/minute.

|                      |      |      |      |
|----------------------|------|------|------|
| supernatant probă    | 2 ml | —    | —    |
| supernatant martor   | —    | 2 ml | —    |
| supernatant standard | —    | —    | 2 ml |
| fenantrolină         | 2 ml | 2 ml | 2 ml |

Se amestecă și se lasă în repaus 5 minute.

Extincțiile se citesc la  $\lambda = 510 \text{ m}\mu$  în cuvă de 1 cm probele, martorul și standardul față de apă distilată.

Calcul:

$$\mu\text{gFe}\% \text{ ml ser} = \frac{E_P - E_m}{E_s - E_m} \times 200$$

Observații: pentru a evita erori în dozare, toată sticlăria să fie perfect curată iar apa întrebuițată este numai cea bidistilată.

Valori normale:

90—100  $\gamma$  Fe% ml ser pentru femei  
130—140  $\gamma$  Fe% ml ser pentru bărbați

Variația concentrației fierului în ser este mai mare dimineața și scade spre seară.

Valori crescute sînt întîlnite în anemii hemolitice, în hemocromatoză, anemie aplastică, anemii sideroacrestice, hepatite acute.

Valori scăzute în hemoragii, în anemii feriprive, în carențe alimentare, avitaminoze, infecții, tumori maligne, tulburări de absorbție.

## DOZAREA FOSFORULUI ÎN SER

### Metoda Bell-Doisy Briggs

#### Principiu:

Fosforul anorganic formează cu acidul molibdenic, acidul fosfomolibdenic care este redus în albastru de molibden de către acidul ascorbic.

#### Reactivi:

1 — acid tricloracetic 20%

2 — soluție acid molibdenic:

- a) soluție molibdat de amoniu .. 25 g  
apă distilată ..... 300 ml
- b) soluție acid sulfuric  
apă distilată ..... 125 ml  
acid sulfuric..... 75 ml

După dizolvarea soluției a) și răcirea soluției b) se amestecă și se completează la 500 ml cu apă distilată.

3. — soluție hidrochinonă 0,5% la care se adaugă o picătură de  $H_2SO_4$  concentrat

4. — soluție sulfat de sodiu 20% proaspătă

— soluție standard de fosforofosfat acid de potasiu ( $KH_2PO_4$ ) 0,4394 g/100. Pentru conservare se pun câteva picături de cloroform.

Din această soluție se iau 25 ml și se completează la 200 ml cu apă.

2 ml din această soluție = 0,025 g fosfor.

**Modul de lucru:** într-o eprubetă de centrifugă se pipetează:

|                    |      |
|--------------------|------|
| ser                | 2 ml |
| apă distilată      | 6 ml |
| acid tricloracetic | 2 ml |

Repaus 10 minute, filtrare sau centrifugare:

|                 | Probă | Standard | Blanc |
|-----------------|-------|----------|-------|
| filtrat         | 5 ml  | —        | —     |
| etalon          | — ml  | 2 ml     | —     |
| apă             | 1 ml  | 4 ml     | 6 ml  |
| acid molibdenic | 2 ml  | 2 ml     | 2 ml  |
| sulfat Na       | 1 ml  | 1 ml     | 1 ml  |
| hidrochinonă    | 1 ml  | 1 ml     | 1 ml  |

Se lasă în repaus 30 de minute, se citește extincția probei și a etalonului față de martor la  $\lambda = 630$  m $\mu$  sau la fotometru cu filtru roșu, cuvă 1 cm.

#### Calcul:

$$\text{mg fosfor la 100 ml ser} = \frac{E_p}{E_s} \times 5 \times 100$$

#### Valori normale:

Ser adult = 3,5 mg fosfor %

Ser copil = 5 mg fosfor %



## DOZAREA IODULUI PROTEIC SANGUIN

### Reactivi:

sulfat de zinc ..... 10 g%  
 KOH ..... 2 N  
 NaCl Merck  
 Brucină Merck  
 KI  
 Acid sulfuric conc.

- Apă bidistilată pe NaOH și complet deionizată pe schimbători de ioni.
- Serul de testat proaspăt sau păstrat la congelator înghețat.

Soluție arsenit: 20 ml soluție NaCl 1 N

2 ml soluție  $As_2O_3$  0,1 N în KOH 7%

50 ml  $H_2SO_4$  4 N

se aducă la 100 ml cu apă distilată

Brucină 1% în acid acetic 0,1 N

sulfat ceric 0,008 în  $H_2SO_4$  3 N

soluție standard: 100  $\mu g$  KI/ml

aparatură:

etuvă termoreglabilă la 100—110°C

cuptor pentru incinerare la 600°±10°C

Toate soluțiile se pregătesc în apă deionizată. De asemenea întreaga sticlărie se spală cu această apă.

### Modul de lucru:

|               | Probă  | Blanc  |
|---------------|--------|--------|
| ser           | 0,5 ml | —      |
| apă distilată | 0,5 ml | 1 ml   |
| $SO_4Zn$      | 0,5 ml | 0,5 ml |
| KOH 2N        | 1 ml   | 1 ml   |

Uscare la etuvă 24 ore 100°C. Incinare la cuptor la 600°C 70 minute.

Răcire.

soluție arsenit 2 ml 2 ml

apă 2 ml 2 ml

10 minute centrifugare la 4 000—5 000 t/minut

supernatant 2 ml 2 ml

10 minute la gheață

sulfat ceric 1 ml 1 ml

Incubare la baie de apă la 40°C, 20 minute

10 minute la gheață

soluție acetică brucină 0,26 ml 0,26 ml

15 minute la etuva 100°C.

Citirea la spectrofotometru  $\lambda = 430 m\mu$ .

Valori normale: 4—8  $\mu g/100$  ml ser

## ENZIME ȘI HORMONI ÎN LICHIDELE BIOLOGICE

### HORMONI ÎN LICHIDELE BIOLOGICE

#### DOZAREA 17-CETOSTEROIZILOR TOTALI ÎN URINĂ

**Principiu:** 17-cetosteroizii prin intermediul grupei metilen și al funcției cetonice dau cu metadinitrobenzenul în mediul alcalin o culoare caracteristică roșu-violet (reacția Zimmerman).

**Reactivi:**

- acid clorhidric conc.
- dicloretan
- hidroxid de sodiu pastile
- " " potasiu pastile
- alcool absolut purificat cu metafenilen diamină
- alcool 96°
- metadinitrobenzen
- soluție standard androsteronă 50 mg%
- reactiv Zimmerman:

|    |                       |        |
|----|-----------------------|--------|
| a) | KOH .....             | 2 g    |
|    | apă distilată .....   | 1 ml   |
|    | alcool absolut .....  | 9 ml   |
| b) | m-dinitrobenzen ..... | 2 g    |
|    | alcool absolut .....  | 100 ml |

În momentul întrebuițării se amestecă V/V, soluțiile a și b.

**Recoltarea:**

Se recoltează urina din 24 ore într-un singur vas. La bărbați recoltarea se face fără restricții, iar la femei se exclude perioada menstruală inclusiv 2—3 zile înainte și după. Nu se administrează bolnavului (circa 2—3 zile) medicamente în afară de antibiotice și corticoterapice, iar în ajun îngerează lichide normal.



### Pregătirea probelor:

#### 1. — hidroliza urinii:

urina din 24 ore..... 10 ml  
HCl conc. .... 3 ml

Se fierbe 10 minute pe baie Marie.

#### 2. — extracția: urina hidrolizată este tratată cu:

dicloretan ..... 10 ml

Se agită 15 minute pe agitator mecanic, se transferă conținutul baloanelor în eprubete de centrifugă și se centrifughează 5 minute la 1 000—1 500 ture/minut; se aspiră cu trompa de vid pătura superioară, se filtrează în baloane uscate de 100 ml. Extractului obținut i se adaugă:

NaOH (20 pastile)..... 2 g

Se agită 15 minute și se filtrează în eprubetă gradată, lăsând să cadă în eprubetă doar 5 ml extract, se aduce la sec sub curent de aer cald. Paralel cu probele se lucrează și martorul care conține în loc de urină 10 ml apă.

### Modul de lucru:

Extractelor li se adaugă:

|                        | Probă  | Martor |
|------------------------|--------|--------|
| extract alcool absolut | 0,2 ml | 0,2 ml |
| reactiv Zimmerman      | 0,4 ml | 0,4 ml |

Se agită și se menține la întuneric 1 oră la 25°

|        |      |      |
|--------|------|------|
| alcool | 5 ml | 5 ml |
|--------|------|------|

Citirea se face la colorimetru filtru verde sau la spectrofotometru  $\lambda = 520$  m $\mu$ , cuva de 1 cm.

Calcul: se scade extincția martorului din aceea a probei și apoi se calculează rezultatul folosind curba de etalonare obținută cu cel puțin 3 diluții din soluția standard de androsteronă. La calcul se ține seamă de volumul urinii luat în lucru și de cel emis în 24 ore de pacient.

### Valori normale:

femei: 8—10 mg în 24 ore  
bărbați: 12—15 mg în 24 ore  
copii sub 7 ani: 1,3 mg în 24 ore  
copii 7—12 ani: 4 mg în 24 ore.

Valori scăzute se întâlnesc în unele boli hipofizare, boala Addison în insuficiența testiculară. Scade într-o serie de boli generale ca: viroze avansate, tuberculoză, poliartrită reumatismală și colită ulceroasă.

Valori crescute în tulburări testiculare, ovariene și corticosuprarenale, precum și în stări de hiperfuncție corticosuprarenală, sindromul adreno-genital și sindromul Cushing.

## DOZAREA ESTROGENILOR TOTALI

### Metoda Jayle

*Principiu:* estrogeni conjugați din urină sub acțiunea glucuronidazei de *Helix* sint hidrolizați și separați în faza fenolică.

#### *Reactivi:*

- eter etilic proaspăt distilat pe KOH
- etanol absolut distilat de 2 ori
- soluție tampon pH = 5,2
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ..... 9%
- $\text{NaHCO}_3$  pulbere
- hidrochinonă 4% (soluție etanolică)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (D = 1,83) conc.
- NaOH N
- Suc digestiv de *Helix* pomația

#### *Modul de lucru:* hidroliza urinii:

100 ml urină din 24 ore  
se aduce la pH = 5,2 cu acid acetic 1/5  
tampon aceto-acetic pH = 5,2 — 10 ml  
suc *Helix* pomația ..... 1 ml  
Se menține 18 ore la 37°C.

#### *Extracția:*

Se trece urina de 15 ori peste 150 ml eter etilic pe coloana de extracție, extractul se spală cu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  9% de 2 ori cu 75 ml.

Estrogenii se extrag din stratul eteric cu NaOH N de 2 ori câte 75 ml și apoi se saponifică prin fierbere la reflux 30 minute.

Se răcește și se titrează cu  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrat în prezența de roșu fenol până la viraj spre galben.

Se răcește și se saturează cu  $\text{NaHCO}_3$  (pulbere) până la pH = 8–8,5 cu viraj spre roz.

Soluția alcalină se reextrage cu 200 ml eter etilic în pilnie de separare prin agitare timp de 6 minute.

Se spală cu 50 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  N/30 și 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  distilată.

Se evaporă eterul la sec pe baie de apă.

Extractul sec se reia în 5 ml alcool absolut se fac probe duble câte 2 ml și se evaporă la sec, se adaugă:

- soluție hidrochinonă 4% ..... 0,2 ml

Se evaporă la sec sub azot

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  26 N ..... 0,6 ml

Se fierbe 20 minute, se agită fiecare probă de 2 ori în primele 2 minute.

Se răcesc probele pe gheață și se adaugă:

- amestec  $\text{H}_2\text{SO}_4$  31,5% conținând 0,01 g% azotat de sodiu .... 1,4 ml



Citirea se face la  $\lambda = 476,516,556 \text{ m}\mu$  după 30 minute.

Totalul de estrogeni exprimat în  $\mu\text{g}$  de echivalent de estronă se raportează la volumul urinei din 24 ore.

Valori normale:

femei în a 14-a zi a ciclului: 18—30  $\mu\text{g}/24 \text{ ore}$ .

Dozarea complexului pregnandiol (CPG), vezi adendum.

## ENZIME ÎN LICHIDELE BIOLOGICE

Enzimele sînt biocatalizatori de natură organică elaborate de microorganisme, plante și animale. Au un rol fundamental în rezolvarea proceselor metabolice, precum și în toate procesele de creștere și regenerare tisulară. Modifică viteza reacțiilor biochimice fără ca să se consume, au acțiune reversibilă și totodată cantități minime pot produce transformarea unor cantități foarte mari de substrat. Enzimele s-au dovedit a fi proteine conjugate cu o grupare prostetică, grupare care poate fi o vitamină, un hormon sau un ion metalic. Gruparea prostetică poartă denumirea de coenzimă sau coferment.

(Exemplu: piridin nucleotida NAD și NADP, flavinadenindinucleotid, piridoxalfosfat etc).

Partea proteică porată denumirea de apoenzimă sau apoferment. Schematizată structura enzimei poate fi reprezentată astfel:

enzima = proteină + grup prostetic  
sau după Euler:

holoenzime = apoenzima + coenzimă.

O caracteristică importantă a enzimelor este specificitatea lor adică activitatea pe care o exercită asupra unui anumit substrat.

Specificitatea de acțiune a enzimelor este dată de partea proteică a enzimei „apoenzima” și anume de centrul activ al ei care nu este altceva decît o anumită secvență de aminoacizi. Clasificarea enzimelor se bazează pe reacția catalitică a enzimei precum și pe substratul asupra căruia acționează enzima.

Astfel se disting:

**Oxidoreductazele** sînt enzime care catalizează reacții de tip oxidoreducător, respectiv catalizează transportul de hidrogen și de electroni.

Catalizează specific oxidarea substratului cu grupări de tipul  $\text{CH}-\text{OH}$ , cum sînt: hidroxiacizii, acidul malic, acidul citric, acidul lactic, alcoolii secundari, glicerina și unii compuși ai săi, glucidele precum și alți compuși hidroxilați.

**Transferazele** sînt enzime care catalizează reacțiile de transfer al unui fragment molecular de pe un substrat numit donor pe altul numit acceptor. Se consideră că, în acest caz, energia de legătură a grupării care se transferă este conservată. Exemplu de transferaze: transaminazele, aciltransferazele, fosfo-transferazele.

**Hidrolazele** sînt enzimele care catalizează reacții de scindare a moleculelor substratului pînă intermediul apei. Din acest grup fac parte enzimele care

hidrolizează proteinele pînă la aminoacizi, polizaharidele pînă la monozaharide și lipidele pînă la acizi grași și glicerină.

**Liazele** sînt enzime care intervin în reacțiile de sinteză și degradare fără hidroliză și fără fenomenul de tip redox. Ex. de liaze: aldehidliazele (aldolaza), carboxilazele (piruvat-decarboxilaza).

**Izomerazele** și **racemazele** sînt enzime care catalizează reacțiile de izomerizare a substanțelor optice active.

**Ligazele** sînt enzime care leagă două molecule simultan cu intervenția ATP. Mecanismul de acțiune al ligazelor este asemănător cu cel al fosfokinazelor și transferazelor.

Denumirea enzimelor individuale include denumirea substratului și acțiunea principală a enzimei.

Activitatea enzimatică se exprimă în unități/ml. Unitatea de măsură (U) reprezintă cantitatea de enzimă care poate să convertească un  $\mu$  mol de substrat pe minut în condiții stabilite.

$$1 \text{ U/ml} = \frac{1 \mu \text{ mol substrat transformat}}{1 \text{ minut} \times 1 \text{ ml}}$$

Factorii care influențează activitatea enzimelor sînt: temperatura, pH-ul, electroliții, concentrația substratului și a enzimei. De asemenea activitatea acestora este în funcție și de substanțele activatoare sau inhibitoare prezente în sistemul de lucru. Determinarea activității enzimatică se face prin 2 căi:

- a) prin măsurarea metabolizării substratului în unitatea de timp;
- b) prin măsurarea concentrației substratului înainte și după acțiunea enzimei.

Unele enzime care au drept coenzimă nicotin-amidoadenin-dinucleotidul (NAD), sau nicotin-amidoadenindinucleotid fosfatul (NADP) pot fi determinate prin metode care se bazează pe absorbția în ultraviolet.

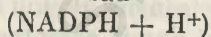
Principiul acestor metode constă în modificarea densității optice a coenzimei în timpul reacției enzimatică.

Există 2 tipuri de reacții: reacția directă și reacția cuplată.

**Reacția directă.** Reacția enzimatică transformă complet substratul A în produsul B.



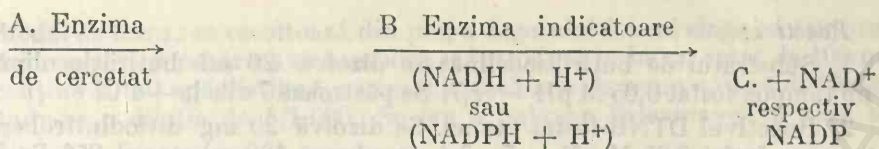
sau



**Reacția cuplată.** Reacția enzimatică transformă în prima etapă substratul A în produsul intermediar B, care apoi printr-o a doua reacție enzimatică (NAD, NADP) îl transformă în produsul C.

Prin acest procedeu se determină indirect activitatea enzimatică care acționează în prima reacție.





Determinarea activității enzimatică se face cu scopul de a obține informații cu privire la buna desfășurare a proceselor metabolice dintr-un țesut, organ sau organism în întregime; investigațiile se fac în țesuturi prin punctii sau biopsii, în lichidele circulante, sânge, limfă, lichid cefalo-rahidian sau în secreții sau excreții.

## DOZAREA ACTIVITĂȚII COLINESTERAZEI SERICE

### 1) Macrometoda (metoda Michel)

*Principiu:* colinesteraza hidrolizează acetilcolina în colină și acid acetic, care acid se dozează titrimetric cu soluție NaOH 0,01 N.

*Reactivi:*

- soluție extemporanee acetilcolină 2%  
acetilcolină ..... 2 g  
apă ..... 100 ml
- soluție fenoltaleină 1%  
fenoltaleină ..... 1 g  
apă ..... 100 ml
- NaOH 0,01 N

*Modul de lucru:* în 2 baloane se amestecă:

|                            | Probă        | Martor       |
|----------------------------|--------------|--------------|
| apă .....                  | 4 ml         | 4 ml         |
| soluție acetilcolină ..... | 1 ml         | 1 ml         |
| fenoltaleină .....         | 2-3 picături | 2-3 picături |

Se lasă 5' la 37°C pentru verificarea reactivilor care trebuie să fie incolori.

|     |      |                       |     |
|-----|------|-----------------------|-----|
| Ser | 1 ml | 1 ml inactivat la 50° | 30' |
|-----|------|-----------------------|-----|

Se lasă 30' la 37°

Se titrează cu NaOH 0,01 N până la virare de la violet la galben.

*Calcul:*

Activitatea colinesterazei = nr. ml NaOH 0,01 N întrebuințați la titrarea probei minus nr. ml NaOH întrebuințați la titrarea probei martor.

*Valori normale:* 3-6 ml NaOH

### 2) Micrometoda

*Principiu:* colinesteraza hidrolizează butiriltiocolina în tiocolină care în prezența acidului 2-ditiodinitrobenzoic (DTNB) formează un complex colorat (galben) cu maximum de adsorbție la  $\lambda = 412$  m $\mu$ .

### Reactivi:

1. Substratul de butiriltiocolină: se dizolvă 20 ml butiriltiocolină în 20 ml tampon fosfat 0,05 M pH = 7,7. Se păstrează 7 zile la +4°C.

2. Reactivul DTNB-fosfat etanol. Se dizolvă 20 mg ditiiodinitrobenzoic în tampon fosfat 0,05 M pH = 7—7,4, se adaugă 120 ml etanol 95°. Se ajustează pH-ul la 7,4—7,6 și se completează la 250 ml cu tampon fosfat.

### Modul de lucru:

|                      | Probă             | Martor       |
|----------------------|-------------------|--------------|
| ser 1/10<br>substrat | 0,02 ml<br>0,2 ml | —<br>0,22 ml |
| 10 minute la 25°C    |                   |              |
| DTNB                 | 2 ml              | 2 ml         |

Extincțiile probelor se citesc în cuve de 1 cm la  $\lambda = 405$  m $\mu$  față de mar-tor.

Pentru calcul se folosește următoarea formulă:

$$\text{unități colinesterază/ml ser} = \frac{EP}{EM} \times 8,4$$

Valori normale: 3—8 U/ml ser

O unitate reprezintă activitatea enzimatică care hidrolizează 1 micromol substrat/minut la 25°C.

### Interpretare:

Enzima fiind produsă de ficat și secretată în plasmă, cantitatea determi-nată reprezintă date asupra funcției proteosintetice a ficatului. În perioada de sarcină activitatea colinesterazei este scăzută.

Scade în hepatitele subacute, în ciroze atrofice decompensate și în meta-staze hepatice, în distrofia musculară, miotonia congenitală Thompson, into-xicații cu insecticide organofosforice, în caz de lipsă de proteine din alimenta-ție și în stări de cașexie tumorală.

Puternic scăzută în leucemia paramieloblastică acută.

Activitatea crescută se întâlnește în stări de adipozitate extremă și ne-froză.

Crește în ictere prin neoplasm de cap de pancreas.

## DOZAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI SERICE

### I. Metoda Bach-Zubcova

*Principiu:* catalaza este enzima care descompune apa oxigenată cu eli-berare de oxigen molecular. Activitatea enzimei se determină prin cantitatea de apă oxigenată descompusă de catalază în 30 minute la 17° C (Atenție! la 37°C este activă proteaza care distruge catalaza).

### Reactivi:

- soluție perhidrol 1% (3,3 ml perhidrol în 100 ml apă)
- acid sulfuric 10%
- permanganat de potasiu 0,1 N
- alcool amilic



**Modul de lucru:** se recoltează din pulpa degetului 0,1 ml sînge cu ajutorul unei micropipete și pentru a se hemoliza se introduce în balon cotat de 100 ml care conține 10 ml apă distilată, se completează apoi la semn cu apă distilată, obținindu-se o diluție de 1/1 000. Se iau 4 baloane Erlenmayer în care se introduc:

|               | Proba <sub>1</sub> | Proba <sub>2</sub> | Martor <sub>1</sub> | Martor <sub>2</sub> |
|---------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| apă distilată | 10 ml              | 10 ml              | 10 ml               | 10 ml               |
| sînge 1/1000  | 1 ml               | 1 ml               | 1 ml                | 1 ml                |

Se fierb 30 minute baloanele cu martor 1 și 2 pentru a distruge activitatea catalazei și apoi se răcesc.

|                                        |        |        |        |        |
|----------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| soluție perhidrol 1%                   | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   |
| Se agită și se lasă 30 minute la 17°C. |        |        |        |        |
| acid sulfuric                          | 5 ml   | 5 ml   | 5 ml   | 5 ml   |
| alcool amilic                          | 0,3 ml | 0,3 ml | 0,3 ml | 0,3 ml |

Se titrează toate probele cu permanganat de potasiu pînă la culoarea roz stabilă. Numărul de ml permanganat de potasiu N/10 folosiți la titrarea probelor evidențiază apa oxigenată rămasă nedescompusă.

**Calcul:**

$$\text{activitatea catalazei} = (N - N') \times 1,7$$

N = media cantității în ml de permanganat folosit la titrarea martorilor;

N' = media cantității în ml de permanganat folosit la titrarea probelor.

Echivalentul gram al apei oxigenate = 17.

1 ml permanganat de potasiu N/10 corespunde la 1,7 mg apă oxigenată.

$$\text{Indicele catalazei} = \frac{(N - N') \times 1,7}{\text{nr. milioane gl. roșii}}$$

Valori normale:

$$\text{indicele catalazei} = 14 - 18.$$

**Interpretare:**

Numai indicele catalazei are valoare de diagnostic deoarece acești indici pot fi comparați între ei.

Indicele catalazei este scăzut în cancer, anemie, cașexie și în 80% din afecțiunile hepatice.

## DOZAREA ACTIVITĂȚII TRIPSINEI ÎN SUCUL PANCREATIC

### Metoda I

**Principiu:** tripsina este enzima proteolitică care continuă digestia substanțelor proteice începută în stomac, pînă la stadiul de polipeptide și acizi aminați.

**Metoda calitativă.** Se bazează pe acțiunea tripsinei asupra soluției de gelatină 5%.

**Reactivi:**

Soluție gelatină 5%.

**Modul de lucru:** într-o placă Petri se toarnă 20 ml soluție de gelatină 5% fierbinte. După răcire pe suprafața gelului se pipetează câte o picătură din diluțiile sucului pancreatic:

1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.....1/350.

Se lasă în repaus 24 ore la 37°C. Acțiunea tripsinei este apreciată prin formarea godeurilor pe suprafața gelatinei.

## Metoda II

**Principiu:** acizii aminați eliberați din gelatină timp de 1 oră la 37°C sub acțiunea tripsinei se pot doza după metoda Sørensen (formol titrarea).

### Reactivi:

1. — soluție gelatină neutralizată:

gelatină ..... 5 g  
apă distilată ..... 100 ml

Se încălzește pînă la solubilizare și apoi se adaugă:

fenolftaleină 1% ..... 0,5 ml  
NaOH 0,1 N ..... pînă la neutralizare.

2. — soluție formol neutralizat 20%

3. — soluție NaOH 0,1 N

4. — soluție fenolftaleină 1%.

**Modul de lucru:** într-un balon Erlenmayer se pipetează:

|                                                       | Probă  | Martor |
|-------------------------------------------------------|--------|--------|
| soluție gelatină                                      | 25 ml  | 25 ml  |
| suc pancreatic                                        | 1 ml   | —      |
| 1 oră la 37°C                                         |        |        |
| fenolftaleină                                         | 0,5 ml | 0,5 ml |
| Se titrează cu NaOH N/10 pînă la viraj roz pal formol | 10 ml  | 10 ml  |

Se titrează cu NaOH 0,1 N pînă la viraj roz intens.

Calcul:

Activitatea triptică/1 ml suc gastric =  $N-n$

$N$  = ml NaOH 0,1 N întrebuințați la probă.

$n$  = " " " " martor.

Valori normale: 10 ml soluție NaOH 0,1 N.

Determinarea tripsinei în ser nu este concludentă, deoarece singele conține o antitripsină. Este mai util testul antitrombinei (vezi hematologie).

## DOZAREA ACTIVITĂȚII UROPEPSINEI

### Metoda Anson, Merski și Bucher

**Principiu:** uropepsina acționează asupra substratului de hemoglobină în mediu ușor acid cu punerea tirozinei în libertate. Tirozina în prezența reactivului fosfo-wolframic și a sulfatului de litiu, în mediul alcalin dă o culoare albastră.

**Reactivi:** substrat de hemoglobină.

Singele recoltat pe citrat de sodiu este centrifugat. Hematiile spălate cu ser fiziologic se centrifugă. După decantare se adaugă acestor hematii două



volum de apă distilată, se produce liza acestora și apoi se determină concentrația de hemoglobină. Se aduce la concentrația de 6% în momentul întrebuițării, se amestecă 2 volume de substrat cu 3 volume HCl 0,1 N.

- soluție acid tricloracetic 56<sup>0</sup>/<sub>00</sub>
- soluție HCl 0,1 N
- soluție NaOH 0,5 N
- reactiv Folin-Ciocalteu (ca la proteine)
- soluție etalon tirozina:
  - tirozină ..... 100 mg
  - acid sulfuric N..... 100 ml

În momentul întrebuițării se diluează 1/10.

*Modul de lucru:* în 3 eprubete se pipetează:

|                          | Proba activă | Proba inactivă | Etalon |
|--------------------------|--------------|----------------|--------|
| urina                    | 0,2 ml       | 0,2 ml         | —      |
| substrat hemoglobină     | 1 ml         | 1 ml           | —      |
| acid tricloracetic       | —            | 2 ml           | —      |
| Agitare 1 h la 37°C.     |              |                |        |
| Acid tricloracetic       | 2 ml         | —              | —      |
| Se agită și se filtrează |              |                |        |
| filtrat                  | 0,4 ml       | 0,4 ml         | —      |
| etalon tirozină diluată  | —            | —              | 0,2 ml |
| apă distilată            | 2,4 ml       | 2,4 ml         | 1,8 ml |
| NaOH 0,5 N               | 1,6 ml       | 1,6 ml         | 1,6 ml |
| HCl 0,01 N               | —            | —              | 0,8 ml |
| reactiv Folin diluat 1/3 | 0,6 ml       | 0,6 ml         | 0,6 ml |

Se agită 30 minute la temperatura laboratorului, la întuneric. Citire la  $\lambda = 580$  m $\mu$  față de apă distilată.

Calcul:

$$\frac{\text{extincția probei active} - \text{extincția probei}}{\text{extincția etalon}} \times 80 = \text{activitatea uropepsinei}$$

exprimată în mg tirozină la 100 ml urină.

Rezultatul final se raportează la urina din 24 ore.

Valori normale:

60—250 mg tirozină în 24 ore.

*Interpretare:*

— În general valorile uropeptice merg în paralel cu valorile activității sucului gastric.

— Valori crescute sînt în ulcerul duodenal și gastric. Uropepsina nu depășește normalul în afecțiunile digestive, neulceroase, chiar acolo unde sînt prezente valori hiperacide.

— Valori scăzute se întîlnesc în cazul rezecției subtotale pentru ulcer.

Uropepsina nocturnă la bolnavii de ulcer este crescută față de cea diurnă (invers decît la normali).

## DOZAREA ACTIVITĂȚII EREPSINEI ÎN SUCUL DUODENAL

**Principiul:** erepsina scindează albumozele, peptonele și polipeptidele la pH = 7,8 pînă la stadiul de acizi aminați.

**Reactivi:**

- 1) soluție de peptonă 2%
- 2) soluție de sulfat de cupru 0,1 %
- 3) soluție NaOH 40%
- 4) soluție NaCl 10%

**Modul de lucru:** se pipetează în 2 eprubete:

|                                                                                                      | Probă        | Martor       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------|
| suc duodenal                                                                                         | 5 ml         | 5 ml         |
| soluție de peptonă 2%                                                                                | 2 ml         | 2 ml         |
| numai eprubeta martor este inactivată 5 minute la fierbere                                           |              |              |
| Toluen                                                                                               | 1—2 picături | 1—2 picături |
| 24 h la 37°C.                                                                                        |              |              |
| din fiecare eprubetă se iau 2 ml                                                                     |              |              |
| acid acetic                                                                                          | 1—2 picături | 1—2 picături |
| NaCl                                                                                                 | 1 ml         | 1 ml         |
| 20' la fierbere pentru deproteinizare și centrifugare la 3 000 t/minut. Supernatantului i se adaugă: |              |              |
| NaOH 40%                                                                                             | 1 ml         | 1 ml         |
| Cu SO <sub>4</sub> 0,1%                                                                              | 2—3 picături | 2—3 picături |

**Rezultate:** în prezența pepsinei apare o colorație roșie-violet. În prezența aminoacizilor eprubetele rămîn incolore. Se apreciază: lipsa de culoare = reacție pozitivă (++) culoare puțin intensă = reacție slab pozitivă (+); culoare roșu-violet = reacție negativă (—).

## DOZAREA ACTIVITĂȚII AMILAZEI ÎN SER

**Principiu:** amilaza are proprietatea de a hidroliza amidonul pînă la stadiul de dextrină.

### METODE FOLOSITE PENTRU DETERMINAREA ACTIVITĂȚII AMILAZEI

a) Metodele zaharimetrice care determină cantitatea de zahăr reducător obținut din substrat sub acțiunea enzimei în unitatea de timp sînt puțin utilizate în clinică.

b) Metodele colorimetrice care determină schimbarea culorii din violet închis în roz pal, produsă prin reacția amidonului cu iodul.

Pe acest principiu se bazează:

- 1) Metoda Wohlgemuth

**Reactivi:**

— soluție NaCl 9 g%



- soluție amidon 1 g %<sub>00</sub> în NaCl soluție saturată
- soluție Lugol:

|                      |        |
|----------------------|--------|
| I <sub>2</sub> ..... | 0,5 g  |
| KI .....             | 1 g    |
| apă .....            | 10 ml. |

#### Modul de lucru:

Se pipetează în 10 eprubete de hemoliză: 0,2 ml soluție clorură de sodiu. În prima eprubetă se adaugă 0,2 ml ser. Pentru obținerea seriei de diluții a serului se iau din prima eprubetă 0,2 ml după agitare perfectă și se trec în tubul 2 și astfel se face pînă la tubul 10 obținîndu-se diluțiile: 1/2, 1/4... 1/1024.

Se adaugă în fiecare eprubetă 0,4 ml soluție amidon 1%<sub>00</sub> și sint lăsate în baie de apă la 38°C timp de 30 minute. După răcire se adaugă 1 picătură soluție Lugol.

Se citește ultima eprubetă care a rămas incoloră. Activitatea amilazei se exprimă în unități Wohlgemuth (UW). Unitățile Wohlgemuth se calculează înmulțind numitorul fracției cu 2, care arată diluția.

#### Valori normale:

Amilaza ser UW/ml = 16—32

Amilaza urină UW/ml = 8—64

Amilaza salivară UW/ml = 256—2048.

#### 2) Metoda Richtericht

##### Reactivi:

1 — soluție HCl 0,5 N

2 — soluție tampon colidină:

apă distilată ..... 250 ml

soluție colidină (2,5%) ..... 250 ml

HCl 0,5 N ..... 250 ml

NaCl ..... 2,93 g

Se agită, se corectează pH-ul cu HCl pînă la 7,5, se completează pînă la 1 000 ml cu apă distilată.

3 — reactiv iod:

KI ..... 18 g

I<sub>2</sub> ..... 1,8 g

apă pînă la ..... 1 000 ml

Reactivul se diluează 1/200 cu apă distilată în momentul întrebuintării.

4 — substrat amidon.....1 g %<sub>00</sub>

Se prepară proaspăt, în momentul întrebuintării se diluează volum la volum cu tampon.

#### Modul de lucru: într-o eprubetă se pipetează:

|                            | Probă   | Martor  |
|----------------------------|---------|---------|
| soluție tampon substrat    | 1 ml    | 1 ml    |
| HCl 0,5 N                  | —       | 0,5 ml  |
| Incubare 5 minute la 37°C  |         |         |
| ser, urină                 | 0,02 ml | 0,02 ml |
| Incubare 30 minute la 37°C |         |         |
| HCl 0,5 N                  | 0,5 ml  | —       |
| reactiv iod 1/200          | 10 ml   | 10 ml   |

După 10—120 minute, se citește extincția la  $\lambda = 560-620$  m $\mu$ , față de apă distilată.

Calcul:

$$U.I. = \frac{E_M - E_P}{E_M} \times \frac{1\,000}{0,02} \cdot 3,1 \frac{18}{30} \text{ mM/min/l}$$

$$\frac{E_M - E_P}{E_M} \cdot 5166 \text{ mM/min/l.}$$

U.I. = nr. de  $\mu$  moli/min /1 000 ml ser sau urină.

Metoda poate fi utilizată și pentru dozarea amilazei în urină. În acest caz la exprimarea rezultatelor se va ține cont de diureză.

Valori normale:

Ser: 230—2 730 U.I.

Urină: până la 8 000 U.I.

Observații: Pentru salivă se fac diluții: 1/1 000—1/2 000

Pentru suc duodenal 1/10.

Serul poate fi păstrat 10 zile la  $+4^\circ\text{C}$ .

Interpretare: valori crescute ale amilazei se întâlnesc în: pancreatita acută cu valori maxime până la 30 de ore de la debut, iar în cea necrotică până la 72 ore. Revenirea la normal precede atenuarea simptomelor clinice.

Valori crescute: pancreatita cronică în faze acute, carcinomul capului de pancreas, obstrucții ale intestinului, parotidita epidemică, hipertiroidism, în tratamentul cu clorotiazidă și după administrarea de morfină.

Dat fiind că enzima se elimină prin urină, amilazemia va crește în insuficiențele renale.

Valori scăzute în: ciroze, carcinom de ficat, hepatite, alcoolism.

Amilaza urinară crește în: sindroamele acute, în ulcer perforat și colici biliare.

## DOZAREA ACTIVITĂȚII LIPAZEI PANCREATICE

Bondy, Chiray și Lebon

Principiul: lipaza pancreatică scindează grăsimile neutre în glicerol și acizi grași. Aceștia sînt titrați cu NaOH N/10 în prezența fenolftaleinei ca indicator.

Reactivi: — soluție NaOH 0,1 N  
— soluție indicator fenolftaleină 1%  
— untdelemn rafinat  
— alcool  $96^\circ$

Modul de lucru: în 2 baloane Erlenmayer se pune:

|                 | Probă | Marlor |
|-----------------|-------|--------|
| untdelemn       | 10 ml | 10 ml  |
| lichid duodenal | 2 ml  | 2 ml   |
| alcool          | —     | 10 ml  |
| fenolftaleină   | —     | 0,1 ml |



Se agită. Martorul este titrat imediat cu soluție NaOH 0,1 N până la roz-roșu. Proba este ținută 1 oră la 37°. În probă se adaugă apoi alcool 10 ml și se titrează cu NaOH 0,1 N până la aceeași culoare cu martorul.

**Calcul:** activitatea lipazei în ml NaOH = diferența dintre numărul de ml soluție NaOH 0,1 N folosit la probă și martor.

**Valori normale:** activitatea lipazei = 50—60 ml NaOH 0,1 N

**Interpretare:** activitatea lipazică a serului crește alături de activitatea amilazei în afecțiuni inflamatorii acute ale pancreasului, creșterea lipazei este însă mai persistentă.

## DOZAREA ACTIVITĂȚII POLIPEPTIDAZEI

**Principiu:** activitatea polipeptidazelor este determinată prin dozarea grupărilor aminice sau a celor carboxilice eliberate în urma acțiunii enzimatice asupra moleculelor proteice mai mici (polipeptide).

**Reactivi:** peptone Witte 5%

KOH ..... 0,01

soluție alcoolică de fenolftaleină ..... 1%

NaCl ..... 9%

alcool 96°

toluen

**Modul de lucru:** se pipetează în 2 eprubete:

|                 | Probă      | Martor     |
|-----------------|------------|------------|
| ser             | 1 ml       | —          |
| soluție peptonă | 1 ml       | 1 ml       |
| NaCl            | —          | 1 ml       |
| toluen          | 2 picături | 2 picături |
| 48 ore la 37°   |            |            |
| alcool          | 18 ml      | 18 ml      |
| Centrifugare    |            |            |
| supernatant     | 1 ml       | 1 ml       |
| fenolftaleină   | 2 picături | 2 picături |

Se titrează proba și martorul cu soluția KOH 0,01 N până la apariția unei colorații roșu slab.

**Calcul:** activitatea polipeptidazei/1 ml ser =  $N_p - N_m$

$N_p$  = numărul de ml KOH 0,01 N întrebuințat la titrare probă

$N_m$  = numărul de ml KOH 0,01 N întrebuințat la titrare martor.

**Interpretare:** determinarea polipeptidazei se practică în special pentru urmărirea evoluției hepatitelor. Valori crescute se găsesc în afecțiunile hepatice.

În hepatită acută activitatea polipeptidazelor este crescută înaintea testelor de disproteinemii și nu există un paralelism între acestea, pigmentii biliari și activitatea polipeptidazică care se negativează la vindecare.

În leziunile hepatice difuze valorile sînt crescute 100%.

Valori negative se întîlnesc în unele ciroze în care distrugerii mari de parenchim nu mai permit formarea unei cantități suficiente de enzime.

## DOZAREA TRANSAMINAZELOR

Transaminazele au capacitatea de a transfera în condiții standard gruparea aminică de la un aminoacid la un cetoacid cu formarea unui nou aminoacid și a unui alt cetoacid.

Sînt cunoscute două transaminaze cu valoare clinică TGO (transaminaza glutamic-oxal-acetică) și TGP (transaminaza glutamic-piruvică).

1. acid aspartic + acid  $\alpha$ -cetoglutaric  $\rightleftharpoons$  acid glutamic + acid oxalacetic TGO
2. alanină + acid  $\alpha$ -cetoglutaric  $\rightleftharpoons$  acid piruvic + acid glutamic TGP

Transaminazele se pot determina prin metode colorimetrice și spectrofotometrice.

### METODE COLORIMETRICE

**Principiu:** cetoacidul format reacționează cu 2—4 dinitrofenilhidrazina (DNPN) cu formarea unei dinitrofenilhidrazone care în mediul alcalin dă o colorație roșie, a cărei intensitate este proporțională cu activitatea enzimei.

#### 1) Metoda Reetman și Frenkel

*Reactivi:*

1. — soluția tampon fosfat pH = 7,4:
 

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| fosfat disodic .....        | 15 g    |
| fosfat monopotasic .....    | 1,099 g |
| apă distilată pînă la ..... | 500 ml  |
2. — soluție etalon acid piruvic .....
 1 g‰ |
- piruvat de sodiu .....
 0,125 g |
- tampon fosfat .....
 100 ml |

Soluția se diluează 1/10 cu tampon în momentul întrebuițării, ceea ce corespunde la 100  $\mu$ g acid piruvic/ml.

#### 3. — soluție substrat GOT pH = 7,4:

- |                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| acid $\alpha$ -cetoglutaric ..... | 29,2 mg |
| acid DL aspartic .....            | 2,66 g  |
| NaOH N pînă la .....              | 20 ml   |

Se completează cu soluție tampon pînă la 100 ml

#### 4. — soluție substrat GPT pH = 7,4

- |                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| acid $\alpha$ -cetoglutaric ..... | 29,2 mg |
| DL-alanină .....                  | 1,78 g  |
| tampon fosfat pînă la .....       | 100 ml  |

#### 5. — soluție NaOH N

#### 6. — soluție HCl N

#### 7. — soluție 2-4-dinitrofenilhidrazină

- |                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| 2,4 dinitrofenilhidrazină ..... | 19,8 g |
| HCl 1 N .....                   | 100 ml |

Se încălzește încet la 60°C pînă la dizolvarea completă.

#### 8. — soluție NaOH 0,4 N



**Modul de lucru:** se pipetează în 4 eprubete:

|                                                                | Probă GOT | Probă GPT | Etalon | Martor |
|----------------------------------------------------------------|-----------|-----------|--------|--------|
| substrat GOT                                                   | 0,5 ml    | —         | 0,5 ml | 0,5 ml |
| substrat GPT                                                   | —         | 0,5 ml    | —      | —      |
| la 37°C 5'                                                     |           |           |        |        |
| ser uman                                                       | 0,1 ml    | 0,1 ml    | —      | —      |
| Se agită și se ține la +37°C 60' pentru GOT și 30' pentru GPT. |           |           |        |        |
| 2,4 dinitrofenilhidrazină                                      | 0,5 ml    | 0,5 ml    | 0,5 ml | 0,5 ml |
| ser fiziologic                                                 | —         | —         | 0,1 ml | 0,1 ml |
| Se agită, repaus la 37°C, 20'                                  |           |           |        |        |
| NaOH 0,4 N                                                     | 5 ml      | 5 ml      | 5 ml   | 5 ml   |

Se agită și după 5' se citește la  $\lambda = 440-520$  m $\mu$  extincția probei la GOT și GPT și cea a etalonului față de martor.

Calcul:

$$\mu\text{g acid piruvic/ml ser} = \frac{E_p}{E_e} \times 100$$

Pentru a se exprima în unități (U) ( $\mu\text{moli/ml/minut}$ ) valoarea obținută se împarte la timpul de incubare 60 minute pentru GOT și 30 minute pentru GPT și la 88, cifră care reprezintă echivalentul acidului piruvic.

$$\frac{E_p}{E_e} \times \frac{100}{88 \text{ timp (60 sau 30 minute)}} = \mu \text{ moli/ml/minut} = \text{U.I.}$$

1 U.I. = 1 000 miliunități

## 2 Metoda colorimetrică (modificată)

**Reactivi:**

### 1. substrat pentru TGP

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1,5 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 0,20 g |
| acid $\alpha$ -cetoglutaric .....     | 0,03 g |
| DL $\alpha$ -alanină .....            | 1,78 g |
| apă distilată .....                   | 100 ml |

pH-ul substratului este corectat la 7,4 cu NaOH 0,1 N înainte de a se aduce la 100 ml cu apă distilată.

### 2. substrat pentru TOG

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1,5 g  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 0,20 g |
| acid $\alpha$ -cetoglutaric .....     | 0,03 g |
| acid L aspartic .....                 | 1,32 g |

pH-ul substratului este corectat la 7,4 cu NaOH 0,1 N înainte de a se aduce la 100 ml cu apă distilată.

3. reactiv 2—4 dinitrofenilhidrazină (DPNH)..... 20 ml  
HCl 1 N ..... 100 ml

4. NaOH 0,4 N

5. NaCl 8,7 g‰

6. soluție piruvat de sodiu (22 mg % ml apă).

*Modul de lucru:* serul de cercetat trebuie să fie nehemolizat.

|                                                                    | Probă GOT | Probă GPT | Martor GOT | Martor GPT |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| substrat GOT                                                       | 0,5 ml    | —         | 0,5 ml     | —          |
| substrat GPT                                                       | —         | 0,5 ml    | —          | 0,5 ml     |
| ser                                                                | 0,1 ml    | 0,1 ml    | —          | —          |
| apă distilată                                                      | —         | —         | 0,1 ml     | 0,1 ml     |
| Se incubează 60 minute la 37°C pentru GOT și 30 minute pentru GPT. |           |           |            |            |
| 2-4 DPNH                                                           | 0,5 ml    | 0,5 ml    | 0,5 ml     | 0,5 ml     |
| Se lasă în repaus la temperatura laboratorului 20 de minute.       |           |           |            |            |
| NaOH 0,1 N                                                         | 5 ml      | 5 ml      | 5 ml       | 5 ml       |

Se agită și se citesc extincțiile probelor față de martor după 5 minute la  $\lambda = 546 \text{ m}\mu$ , cuvă de 1 cm.

*Calcul:* Extincțiile se citesc pe curbă sau se înmulțesc cu factorul de pantă. Pentru curbă este folosită soluția standard de piruvat de sodiu 22 mg % ml în apă distilată.

Se pregătesc 9 eprubete în care se adaugă volume crescînde din soluția standard piruvat și volume descrescînde de substrat conform, tabelului LXXXVIII.

Tabelul LXXXVIII

| Număr eprubete | ml soluție piruvat standard | ml apă distilată | ml substrat (GOT sau GPT) |
|----------------|-----------------------------|------------------|---------------------------|
| 1              | 0,00                        | 0,20             | 1,00                      |
| 2              | 0,05                        | 0,20             | 0,95                      |
| 3              | 0,10                        | 0,20             | 0,90                      |
| 4              | 0,15                        | 0,20             | 0,85                      |
| 5              | 0,20                        | 0,20             | 0,85                      |
| 6              | 0,25                        | 0,20             | 0,75                      |
| 7              | 0,30                        | 0,20             | 0,70                      |
| 8              | 0,40                        | 0,20             | 0,60                      |
| 9              | 0,50                        | 0,20             | 0,50                      |

Se adaugă în fiecare eprubetă cite 0,5 ml soluție 2-4 dinitrofenil-hidrazină și se lasă în repaus 20 minute la temperatura camerei. Apoi se pipetează în fiecare eprubetă 5 ml NaOH 0,4 N, iar după 5 minute se citesc extincțiile probelor 2-9 față de proba în alb (eprubeta Nr. 1).

Correspondența dintre cantitatea de piruvat și activitatea transaminazică dată de tabelul LXXXIX s-a stabilit în mod comparativ cu determinări efectuate prin teste în ultraviolet.

În cazul serurilor concentrate dacă extincțiile sînt peste 0,26 pentru GOT și 0,37 pentru GPT se diluează serul de 10 ori; rezultatul se va multiplica cu 10.



Tabelul LXXXIX

| Număr eprubete | ml soluție piruvat | mU GOT/ml | mU GPT/ml |
|----------------|--------------------|-----------|-----------|
| 1              | 0,00               | —         | —         |
| 2              | 0,05               | 10        | 6         |
| 3              | 0,10               | 20        | 13        |
| 4              | 0,15               | 32        | 19        |
| 5              | 0,20               | 47        | 28        |
| 6              | 0,25               | 67        | 35        |
| 7              | 0,30               | 93        | 46        |
| 8              | 0,40               | —         | 66        |
| 9              | 0,50               | —         | 99        |

Tabelul XC

Convertirea extincțiilor citite în mU  
Pentru TGP

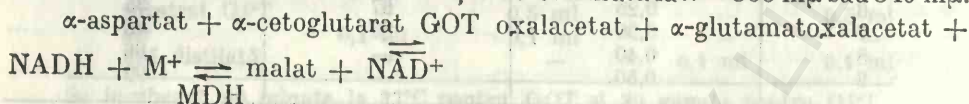
| E     | mU | E     | mU | E     | mU   |
|-------|----|-------|----|-------|------|
| 0,025 | 2  | 0,131 | 17 | 0,220 | 33   |
| 0,033 | 3  | 0,137 | 18 | 0,225 | 34   |
| 0,041 | 4  | 0,143 | 19 | 0,230 | 35   |
| 0,050 | 5  | 0,150 | 20 | 0,235 | 36   |
| 0,056 | 6  | 0,156 | 21 | 0,240 | 37   |
| 0,062 | 7  | 0,162 | 23 | 0,245 | 38   |
| 0,068 | 8  | 0,169 | 24 | 0,250 | 39   |
| 0,075 | 9  | 0,175 | 25 | 0,254 | 40   |
| 0,083 | 10 | 0,180 | 26 | 0,258 | 41   |
| 0,091 | 11 | 0,185 | 27 | 0,262 | 42   |
| 0,100 | 12 | 0,190 | 28 | 0,266 | 43   |
| 0,106 | 13 | 0,200 | 29 | 0,270 | 44   |
| 0,112 | 14 | 0,205 | 30 | 0,275 | 45   |
| 0,119 | 15 | 0,210 | 31 | 0,278 | 46   |
| 0,125 | 16 | 0,215 | 32 | 0,282 | 47   |
| 0,285 | 48 | 0,319 | 57 | 0,345 | 66   |
| 0,289 | 49 | 0,322 | 58 | 0,347 | 67   |
| 0,292 | 50 | 0,325 | 59 | 0,350 | 68   |
| 0,300 | 51 | 0,328 | 60 | 0,352 | 69   |
| 0,304 | 52 | 0,331 | 61 | 0,355 | 70   |
| 0,308 | 53 | 0,334 | 62 | 0,360 | 72   |
| 0,312 | 54 | 0,337 | 63 | 0,365 | 74   |
| 0,316 | 55 | 0,340 | 64 | 0,370 | 75,5 |
| 0,316 | 56 | 0,343 | 65 | 0,375 | 77   |

## Pentru TGO

|       |    |       |      |       |      |
|-------|----|-------|------|-------|------|
| 0,020 | 4  | 0,085 | 17   | 0,180 | 40   |
| 0,025 | 5  | 0,092 | 18   | 0,190 | 44   |
| 0,030 | 6  | 0,100 | 20   | 0,200 | 48   |
| 0,035 | 7  | 0,110 | 21,5 | 0,210 | 52,5 |
| 0,040 | 8  | 0,120 | 24   | 0,220 | 57   |
| 0,045 | 9  | 0,130 | 26   | 0,230 | 62   |
| 0,050 | 10 | 0,140 | 28   | 0,240 | 67   |
| 0,055 | 11 | 0,150 | 31   | 0,250 | 72   |
| 0,060 | 12 | 0,160 | 34   | 0,260 | 80   |
| 0,065 | 13 | 0,170 | 37   |       |      |
| 0,070 | 14 |       |      |       |      |
| 0,075 | 15 |       |      |       |      |
| 0,080 | 16 |       |      |       |      |

**Metoda spectrofotometrică pentru determinarea activității enzimactice a glutamat-oxal-acetat transaminazei (TGO)**

**Principiu:** activitatea GOT este determinată prin viteza eliberării oxalacetatului din reacție. Oxalacetatul sub acțiunea enzimei malic dehidrogenaza (MDH) și în prezența NADH este transformat în malat și  $\text{NAD}^+$ . Viteza de transformare a NADH în NAD este ușor determinată la  $\lambda = 366 \text{ m}\mu$  sau  $340 \text{ m}\mu$ .



**Reactivi:** tampon aspartat pH 7,4  
 tampon fosfat 0,1 M pH = 7,4  
 $\alpha$ -aspartat 0,04 M  
 — soluție NADH 0,012 M  
 — soluție MDH 0,25 mg/ml  
 — soluție  $\alpha$ -cetoglutarat 0,25 M.

**Modul de lucru:** în cuva spectrofotometrului se pipetează:

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| — tampon aspartat .....       | 3,00 ml |
| — NADH 0,012 M .....          | 0,05 ml |
| — MDH .....                   | 0,05 ml |
| — ser .....                   | 0,5 ml  |
| Se agită, se lasă 5' la 25°C. |         |
| $\alpha$ -cetoglutarat .....  | 0,10 ml |

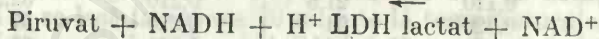
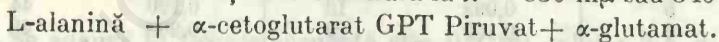
Se agită, se citește imediat extincția la  $\lambda = 366 \text{ m}\mu$  sau  $340 \text{ m}\mu$  la 30'' și apoi la 3 minute față de apă.

**Calcul:**

(Extincția la  $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ , 3 minute — extincția la  $\lambda = 366 \text{ m}\mu$ , 30 secunde)  $\times$  2240 = mU/ml ser, sau (extincția la  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ , 3 minute — extincția la  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ , 30 secunde)  $\times$  1185 = mU/ml.

**Metoda spectrofotometrică pentru determinarea activității enzimactice a glutamat-piruvat-transaminazei (TGP)**

**Principiu:** activitatea GPT este definită prin viteza cu care se formează piruvatul. Acesta sub acțiunea enzimei lactic dehidrogenaza (LDH) și în prezența NADH este transformat în lactat și  $\text{NAD}^+$ . Viteza de transformare a NADH în NAD este ușor determinată la  $\lambda = 336 \text{ m}\mu$  sau  $340 \text{ m}\mu$ .



**Reactivi:** — tampon alanină  
 tampon fosfat 0,1 M pH = 7,4 care conține DL alanină 0,08 M  
 — soluție NADH 0,012 M  
 — soluție LDH 0,25 mg/ml  
 — soluție  $\alpha$ -cetoglutarat 0,25 M



*Modul de lucru:* în cuva spectrofotometrului se pipetează:

|                        |         |
|------------------------|---------|
| — tampon alanină ..... | 3,00 ml |
| — soluție NADH .....   | 0,05 ml |
| — soluție LDH .....    | 0,05 ml |
| — ser .....            | 0,50 ml |

Se agită, se lasă 5' la 25°

|                    |         |
|--------------------|---------|
| cetoglutarat ..... | 0,10 ml |
|--------------------|---------|

Se agită. Se citește imediat extincția la  $\lambda = 366 \text{ m}\mu$  sau  $340 \text{ m}\mu$  la 30" și 3 min. față de apă.

Calcul:

(Ext. la  $366 \text{ m}\mu$  3' — Ext. 30" la  $366 \text{ m}\mu$ ). 2240 = mU/ml ser  
(Ext. la  $340 \text{ m}\mu$  3' — Ext. 30" la  $340 \text{ m}\mu$ ). 1185 = mU/ml ser

Valori normale:

GOT = 12 mU/ml ser

GPT = 10 mU/ml ser.

Raport normal:  $\frac{\text{GOT}}{\text{GPT}}$  este de 1 până la 1,2.

Valori crescute pentru TGP se întâlnesc în special în hepatită virotică acută și în necroza toxică a ficatului.

Hepatita anicterică are drept semn de diagnostic creșterea acestor enzime. În hepatita acută activitatea GPT este mai mare decât a GOT-ului, raportul  $\frac{\text{GOT}}{\text{GPT}}$  fiind subunitar.

În boli hepatice cronice, în majoritatea cazurilor GOT crește moderat iar creșterea activității GPT este mică.

În icterul obstructiv creșterea activității transaminazelor este mică.

GOT crește activitatea în infarctul miocardic cu valori maxime în primele 24—48 ore și cu revenire la normal după 4—7 zile.

Creșterea activității GPT la câteva zile după infarct indică o insuficiență cardiacă dreaptă.

Creșterea transaminazelor serice în cancerle hepatice este un test tot așa de sensibil ca și fosfataza serică, nefiind, spre deosebire de aceasta, influențat prin metastazele osoase.

Tumorile benigne nu sunt însoțite de creșteri apreciable, valori ridicate găsindu-se, în majoritatea cazurilor, la bolnavii cu malignizări.

Făcându-se o corelație între activitatea enzimatică TGO, bilirubină și timol într-un lot de bolnavi cu hepatită acută s-a ajuns la următoarea clasificare:

1. Boli asimptomatice, cu TGO, bilirubină și timol normale.
2. Boli asimptomatice, cu TGO crescut, bilirubină și timol normale.
3. Boli asimptomatice, cu TGO foarte crescut, bilirubină normală și timol normal.
4. Boli simptomatice cu TGO, bilirubină și timol anormale.
5. Boli simptomatice, cu hepatită icterică și teste modificate. Aceste date prezintă o mare importanță epidemiologică, întrucât indică posibilitatea decelării cazurilor importante, care pot fi o sursă de contaminare.

Din punct de vedere al activității transaminazei în ciroze se pot sistematiza următoarele aspecte:

1. Ciroză neevolutivă și compensată, cu teste hepatice anormale și TGO în limitele valorilor normale.

2. Ciroză neevolutivă, dar decompensată, cu manifestări clinice (icter), teste hepatice modificate față de normal și TGO în limite normale.

3. Ciroză evolutivă, dar compensată, cu alterare celulară, fără decompensare, teste hepatice modificate față de normal și TGO crescută.

4. Ciroză evolutivă și decompensată, cu retenție de lichid, hiperbilirubinemie, teste hepatice profund alterate și TGO mult crescută.

Diagnosticul diferențial dintre viroza biliară primară și secundară, pe baza activității TGO, este nesemnificativă.

## DETERMINAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZELOR

Fosfatazele sînt enzime care catalizează hidroliza unor esteri organici ai acidului fosforic. În laboratorul clinic se determină fosfataza alcalină care prezintă activitate maximă la  $\text{pH} = 8,5-10$  și fosfataza acidă prezintă activitate maximă la  $\text{pH} 4,5-5$ .

### DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZEI ALCALINE

#### 1. Metoda Bodansky

*Principiu:* se dozează fosforul anorganic eliberat de enzimă din  $\beta$ -glicerofosfat de sodiu, la  $\text{pH} 8,6$ .

#### *Reactivi:*

##### 1) Soluția stoc $\beta$ -glicerofosfat

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| — glicerofosfat de sodiu .....     | 1 g    |
| — dietil-barbiturat de sodiu ..... | 0,85 g |
| — apă .....                        | 100 ml |

Se agită, se încălzește pînă la dizolvare, se răcește.

##### 2) Soluție substrat tampon $\text{pH} = 8,6$ :

|                                           |        |
|-------------------------------------------|--------|
| soluție stoc $\beta$ -glicerofosfat ..... | 50 ml  |
| NaOH N/10 .....                           | 100 ml |

##### 3) Soluție acid tricloracetic 10%

##### 4) Soluție acid molibdic

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| a) molibdat de amoniu .....       | 25 g   |
| apă .....                         | 300 ml |
| b) acid sulfuric concentrat ..... | 75 ml  |
| apă .....                         | 125 ml |

Se amestecă soluția a și b și se completează la 500 ml cu apă distilată.

##### 5) Soluția acid ascorbic 1% în HCl 0,1 N

##### 6) Soluția stoc fosfat acid de potasiu

|                                |          |
|--------------------------------|----------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... | 0,43949  |
| apă .....                      | 1 000 ml |

Din soluția stoc se iau 25 ml și se completează la 200 ml apă distilată.

2 ml din această soluție corespund la 0,025 mg fosfor.



**Modul de lucru:** în 3 eprubete se pipetează:

|                           | Probă  | Martor | Etalon |
|---------------------------|--------|--------|--------|
| ser                       | 0,5 ml | 0,5 ml | —      |
| substrat                  | 5 ml   | 5 ml   | —      |
| acid tricloracetic        | —      | 4,5 ml | —      |
| Incubarea 1 oră la 37°C   |        |        |        |
| acid tricloracetic        | 4,5 ml | —      | —      |
| Se agită și se filtrează: |        |        |        |
| filtrat                   | 5 ml   | 5 ml   | —      |
| etalon                    | —      | —      | 2 ml   |
| acid molibdenic           | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   |
| acid ascorbic             | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   |
| apă distilată             | 1 ml   | 1 ml   | 4 ml   |

Se agită și se lasă 30 minute la întuneric. Se citește extincția probei, a martorului și a etalonului la  $\lambda = 630 \text{ m}\mu$ , cuva 1 cm.

**Calcul:**

$$\text{Fosfor mg\%} = \frac{E_P - E_M}{E_{\text{etalon}}} \times 0,025 \times 400 = \frac{E_P - E_M}{E_{\text{etalon}}} \times 10$$

**Valori normale:**

**Unități Bodansky:** 1 mg P/oră /100 ml

**Adulți:** 2—4 unități Bodansky

**Copii:** 5—15 unități Bodansky

Transformarea unităților Bodansky în mU/ml se face înmulțind cu factorul 5,4.

## 2) Metoda cu p-nitrofenol

**Principiu:** fosfataza alcalină catalizează hidrolaza p-nitrofenil fosfatului (compus incolor) în fosfat și p-nitrofenolul.

Cantitatea de p-nitrofenol (compus colorat în mediu alcalin) este proporțională cu activitatea enzimatică.

**Reactivi:**

— tampon glicocol pH = 10,5

glicocol ..... 0,75 g

SO<sub>4</sub>Mg · 7H<sub>2</sub>O ..... 60 mg

NaOH (4% = N) ..... 8,5 ml

apă distilată pînă la ..... 100 ml

— p-nitrofenil fosfat disodic 0,4 g

apă distilată ..... 100 ml

— substrat

1 volum p-nitrofenilen fosfat disodic

3 volume tampon glicocol pH = 10,5

— NaOH 0,1 N

*Modul de lucru:* se pipetează în două eprubete:

|                   | Probă  | Martor |
|-------------------|--------|--------|
| soluție substrat  | 2,5 ml | 2,5 ml |
| ser uman          | 0,1 ml | —      |
| 30 minute la 37°C |        |        |
| NaOH 0,1 N        | 10 ml  | 10 ml  |
| ser uman          | —      | 0,1 ml |

Se citește extincția probelor (EP) și a blancurilor respective (EB) față de apă la 450 mμ în cuvă de 1 cm.

*Calcul.*

$(EP - EB) \times 227 = \text{U.I. activitate fosfatazică alcalină}$

Valori normale la adult = 20—48 mU/ml

Valori normale la copii = 28—138 mU/ml

*Interpretări:*

Valori crescute ale fosfatazei alcaline se întâlnesc în rahitism, boala Paget, hiperparatiroidism și în general în afecțiunile osoase însoțite de o reacție osteoblastică. De asemenea creșteri ale fosfatazei alcaline de origine hepatobiliară se întâlnesc în caz de colestază și o creștere de 20—40 ori față de normal în carcinomul de prostată cu metastaze osoase. În rahitism creșterea activității fosfatazei alcaline este considerată a fi cel mai sensibil și sigur test. Cu 30—40 zile înainte ca boala să se manifeste clinic se poate pune în evidență o creștere a fosfatazei alcaline în ser. După tratamentul cu vitamina D, scăderea activității enzimei în ser indică începerea procesului de vindecare. În boala Paget creșterea activității fosfatazei alcaline este în general semn caracteristic. În diferite stadii ale bolii Paget s-au găsit valori de 140—1400 mU/ml. Creșterea persistentă a activității fosfatazei alcaline este de asemenea observată în bolile cu metastaze în ficat.

## DOZAREA ACTIVITĂȚII FOSFATAZELOR ACIDE

Fosfatazele cu activitate optimă în mediul acid ( $pH = 4,9$ ) sînt de diverse proveniențe. Interes clinic prezintă fosfataza prostatică, care fiind inhibată selectiv de tartratul de sodiu forma L poate să fie diferențiată de fosfatazele neprostatice.

**Metoda Bodansky**

*Principiu:* este același ca la dozarea activității fosfatazei alcaline, substratul are  $pH = 4,5-4,9$ .

*Reactivi:*

1. — acid acetic N
2. — soluție de β-glicerofosfat de sodiu (identică ca în cazul fosfatazei alcaline)
3. — substrat  $pH = 4,5-4,9$   
 soluție glicerofosfat (2) ..... 50 ml  
 acid acetic N ..... 5 ml  
 apă distilată pînă la ..... 100 ml
4. — reactivi folosiți la dozarea fosforului (vezi fosfataza alcalină).



**Modul de lucru:** în trei eprubete se pipetează:

|                          | Probă  | Martor | Etalon |
|--------------------------|--------|--------|--------|
| substrat pH = 4,5        | 5 ml   | 5 ml   | —      |
| acid tricloracetic       | —      | 4,5 ml | —      |
| ser                      | 0,5 ml | 0,5 ml | —      |
| Incubare 1 oră la 37°C   |        |        |        |
| acid tricloracetic       | 4,5 ml | —      | —      |
| Se agită și se filtrează |        |        |        |
| filtrat                  | 5 ml   | 5 ml   | —      |
| etalon                   | —      | —      | 2 ml   |
| acid molibdic            | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   |
| acid ascorbic            | 2 ml   | 2 ml   | 2 ml   |
| apă distilată            | 1 ml   | 1 ml   | 4 ml   |

Se agită și se lasă la întuneric 30 minute. Se citește extincția probei, a martorului și a etalonului la  $\lambda = 630$  m $\mu$ , cuva de 1 cm

**Calcul:**

$$\text{mg fosfor} = \frac{E_P - E_M}{EE} \times 0,025 \times 400$$

Transformarea unităților Bodansky în mU se face înmulțind cu factorul 5,4.

**Valori normale:**

adult: 0,05—0,1 UB

copil: 0,20—0,80 UB

**Metoda cu paranitrofenil fosfat de sodiu**

**Principiu:** se determină p-nitrofenolul eliberat din substrat în prezența și în absența tartratului de sodiu. Activitatea inhibată de tartrat corespunde activității fosfatazei acide de origine prostatică.

**Reactivi:**

1 — tampon citrat pH 4,8

— acid citric ..... 0,41 g

— citrat de sodiu ..... 1,2 g

— apă ..... 50 ml

2 — soluție substrat

— p-nitrofenil fosfat de sodiu .. 165 mg

— apă ..... 50 ml

3 — soluție substrat tampon

— Se amestecă 50 ml soluție (1) + 50 ml soluție (2)

4 — tartrat de sodiu 4,6 g%

5 — NaOH 0,02 N

**Modul de lucru:** în trei eprubete se pipetează:

|                             | Martor | P <sub>1</sub> | P <sub>2</sub> |
|-----------------------------|--------|----------------|----------------|
| soluție substrat tampon     | 1 ml   | 1 ml           | 1 ml           |
| soluție tartrat             | —      | —              | 0,1 ml         |
| ser                         | —      | 0,2 ml         | 0,2 ml         |
| menținere 30 minute la 37°C |        |                |                |
| NaOH 0,02 N                 | 10 ml  | 10 ml          | 10 ml          |
| ser                         | 0,2 ml | —              | —              |

După 5 minute citirea probelor se face la  $\lambda = 405$  m $\mu$  față de martor cuve de 1 cm.

**Calcul:**

Activitatea fosfatazei acide mU/ml =  $101 \times (E \text{ probă } 1 - E \text{ probă } 2)$

**Valori normale**

Activitatea fosfatazei acide = 4 mU/ml.

**Fosfataza acidă:** crește în carcinom de prostată și mai ales în carcinomul de prostată prin metastază. Boala Paget și metastazele în os și ficat din carcinomul de sân duc la o creștere semnificativă a activității fosfatazei acide.

**Atenție!** Fosfatazele alcaline și acide se pot determina concomitent prin metodele descrise, diferența fiind numai tamponul folosit, respectiv pH-ul. Se dă metoda King și Armstrong ca exemplu.

### Metoda King-Armstrong

**Principiu:** fosfatazele catalizează hidroliza fenilfosfatului disodic în fosfat și fenol, iar fenolul dă reacție de culoare cu reactivul Folin-Ciocalteu.

**Reactivi:**

1. Tampon alcalin pH = 9:

— veronal sodic ..... 22 g

— apă distilată până la 1 000 ml

Se ajustează pH-ul cu NaOH 1 N

2. Tampon acid pH = 4,9:

— acid citric ..... 38 g

— apă distilată ..... 200 ml

— HCl 0,1 N ..... 200 ml

— NaOH 0,1 N ..... 350 ml

Se aduce cu apă distilată la 1 000 ml

Se controlează periodic pH-ul tamponului.

3. Substrat:

— fenil fosfat disodic ..... 2,2 g

— apă distilată ..... 1 000 ml

4. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ..... 20 g%

5. Soluție etalon de fenol 1 mg/ml:

— fenol ..... 1 g

— HCl 0,1 N ..... 1.000 ml

6. Reactivul Folin-Ciocalteu:

— wolframmat de sodiu ..... 100 g

— molidat de sodiu ..... 25 g



|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| — apă distilată .....       | 700 ml |
| — $H_3PO_4$ (D = 1,75)..... | 50 ml  |
| — HCl conc. ....            | 100 ml |

Soluția se prepară într-un balon cu fund rotund de 1500 ml racordat la un refrigerent, se fierbe 10 ore, apoi se adaugă:

|                                                                                                                                                                       |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| — sulfat de litiu .....                                                                                                                                               | 150 g |
| — apă distilată .....                                                                                                                                                 | 50 ml |
| — brom cîteva picături, pînă cînd se obține o culoare galben aurie. Se răcește balonul și se diluează soluția pînă la 1 000 ml. Pentru lucru soluția se diluează 1/3. |       |

*Modul de lucru:* în 4 eprubete se pipetează:

|                           | Fosfataza alcalină |        | Fosfataza acidă |        |
|---------------------------|--------------------|--------|-----------------|--------|
|                           | Probă              | Martor | Probă           | Martor |
| tampon alcalin            | 2 ml               | 2 ml   | —               | —      |
| tampon acid               | —                  | —      | 2 ml            | 2 ml   |
| substrat                  | 2 ml               | 2 ml   | 2 ml            | 2 ml   |
| ser                       | 0,2 ml             | —      | 0,2 ml          | —      |
| La 37°C                   | 15 minute          |        | 60 minute       |        |
| ser                       | —                  | 0,2 ml | —               | 0,2 ml |
| reactiv Folin-Ciocalteu   | 1,8 ml             | 1,8 ml | 1,8 ml          | 1,8 ml |
| Centrifugare sau filtrare |                    |        |                 |        |
| supernatant sau filtrat   | 4 ml               | 4 ml   | 4 ml            | 4 ml   |
| $Na_2CO_3$ 20%            | 1 ml               | 1 ml   | 1 ml            | 1 ml   |

După 20 minute la 37°C se citesc extincțiile la  $\lambda = 700$  m $\mu$ , față de o probă în alb care conține:

|                                            |        |
|--------------------------------------------|--------|
| — apă distilată .....                      | 2,8 ml |
| — reactiv Folin-Ciocalteu diluat 1/3 ..... | 1,2 ml |
| — $Na_2CO_3$ 20% .....                     | 1 ml   |

Valorile în mg ale fenolului se obțin prin raportarea la o curbă de calibrare.

*Calcul:*

$$UKA = x \cdot 760$$

x = mg fenol eliberat de fiecare probă

1 UKA corespunde unei activități enzimactice care duce la eliberarea a 1 mg fenol în decurs de 15 minute la 37°C de către 100 ml ser în cazul fosfatazelor alcaline. Pentru fosfatazele acide activitatea este raportată la 60 minute de incubare.

Valori normale:

fosfataza alcalină:

adult: 4—12 UKA

copil: pînă la 20 UKA

fosfataza acidă:

adult: 1—3 UKA

## DOZAREA ACTIVITĂȚII ALDOLAZEI

### Metoda Bruns și Puls

**Principiu:** Aldolaza catalizează reacția de scindare în mediu alcalin a fructozo 1,6 — difosfat în:

1. dihidroxiacetone fosfat

2. D-glicerinaldehidfosfat

Triozele eliberate reacționează cu 2,4 dinitrofenil hidrazina cu formare de hidrazone colorate în roșu-brun.

**Reactivi:**

1. soluție tampon colidină:

|                     |                  |
|---------------------|------------------|
| colidină .....      | 1,3 ml           |
| HCl 2 N .....       | pînă la pH = 7,4 |
| apă distilată ..... | la 100 ml        |

2. soluție sulfat de hidrazină pH = 7,4:

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| sulfat de hidrazină ..... | 9,5 g |
| NaOH 5% .....             | 50 g  |
| apă distilată .....       | 50 ml |

3. soluție monoiod acetic 0,04 g% se aduce cu NaOH N pînă la pH=7,4

4. soluție 2,4 dinitrofenil hidrazină:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| 2,4 dinitrofenil hidrazină ..... | 0,1 g  |
| HCl 2 N .....                    | 100 ml |

5. soluție substrat fructoză 1,6 difosfat de sodiu:

a. fructoză 1,6 difosfat

(sare de bariu) .....

apă distilată .....

HCl 2N..... 1 ml sau mai mult pînă la solubilizarea completă a sării de bariu.

b. sulfat de sodiu .....

apă distilată .....

Se amestecă soluția a + b, se agită, se centrifughează îndepărtându-se precipitatul de BaSO<sub>4</sub>. Supernatantul se aduce la 30 ml primul volum final cu apă și pH = 7,4 cu NaOH N.

6. soluție tricloracetic 10%

7. soluție NaOH N

8. amestec: sulfat de hidrazină — acid monoiod acetic 1:1:1



### Modul de lucru:

|                                             | Probă    | Martor   |
|---------------------------------------------|----------|----------|
| ser                                         | 0,5 ml   | 0,5 ml   |
| tampon colidină                             | 0,5 ml   | 0,5 ml   |
| amestec sulfat de hidrazină                 | 0,4 ml   | 0,4 ml   |
| substrat fructoză 1,6 difosfat Na           | 0,125 ml | —        |
| Menținere 1 oră la 37°C                     |          |          |
| acid tricloracetic                          | 1,5 ml   | 1,5 ml   |
| substrat fructoză 1,6 difosfat Na           | —        | 0,125 ml |
| Repaus 10 minute, centrifugare sau filtrare |          |          |
| filtrat sau supernatant                     | 1 ml     | 1 ml     |
| NaOH N                                      | 1 ml     | 1 ml     |
| Menținere 10 minute la temperatura camerei. |          |          |
| 2,4 dinitrofenilhidrazină                   | 1 ml     | 1 ml     |
| Menținere 10 minute la 37°C                 |          |          |
| NaOH N                                      | 7 ml     | 7 ml     |

După 10 minute se citește extincția probei și a martorului față de apă distilată la  $\lambda = 530 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm.

#### Calcul:

$$U \text{ aldolază/ml} = (E_p - E_m) \times 100$$

#### Valori normale:

Ser: 3—15 u/ml

#### Interpretare:

Determinarea aldolazei are importanță mare în diagnosticul bolilor musculare.

Valori crescute în: distrofia musculară, infarct miocardic, hepatită. În hepatite în prima săptămână de boală, activitatea enzimatică este foarte crescută, putând atinge uneori valori de 146 u. Activitatea aldolazică scade pe măsură ce boala evoluează spre vindecare.

Creșteri ușoare se constată în: icter mecanic, ciroză hepatică, metastază hepatică, nefroze.

### CITOENZIME

#### Determinarea activității glucozo-6-fosfat dehidrogenazei (G—6PDH).

Enzima glucozo-6-fosfat dehidrogenază catalizează dehidrogenarea glucozei-6-fosfat în NAD și  $\text{Mg}^{2+}$  rezultând 6-fosfo-glucono-lactonă +  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ .

Activitatea enzimei se determină în funcție de cantitatea de  $\text{NADPH}$  format, care prezintă un maxim de absorbție la  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ .

#### Reactivi:

- tampon tris pH 7,5 = 0,2 M
- glucozo-6-fosfat (sare de sodiu sau potasiu) 0,1 M

— clorură de magneziu 2%

— NaDP 3 mg/ml:

    NADP ..... 3 mg

    apă ..... 1 ml

*Modul de lucru:* reacția are loc în cuva spectrofotometrului:

— tampon TRIS pH = 7,5 ..... 1,4 ml

— glucozo-6-fosfat de Na ..... 0,2 ml

— clorură de magneziu ..... 0,4 ml

— NADP ..... 0,4 ml

— ser ..... 0,4 ml

Se măsoară densitatea optică la 30 secunde și la 3 minute de la adăugarea serului:

(extincția la 3' — extincția la 30'').  $1\ 000 = \text{unități/minut/ml ser.}$

Valori normale 0—30 U/ml.

Valori crescute: în carcinomul de ficat cu metastază, hepatite acute cu colestază.

Valori semnificative în infarctul miocardic în prima săptămână.

### Determinarea activității lactice dehidrogenazei (LDH)

Este enzima care catalizează conversia acidului lactic în prezența NAD rezultând acid piruvic + NADH + H<sup>+</sup>.

Metoda de dozare se bazează pe măsurarea vitezei de formare a NADH care prezintă un maxim de adsorbție la  $\lambda = 340\text{ m}\mu$ .

*Reactivi:*

— tampon fosfat de Na pH = 8,8; 0,1 M

— lactat de sodiu 0,16 M

— NAD 3 mg/ml

*Modul de lucru:* în cuva spectrofotometrului se pipetează:

— tampon fosfat ..... 1 ml

— lactat de sodiu ..... 0,5 ml

— NAD ..... 1 ml

— ser ..... 0,2 ml

Se determină densitatea optică a probelor la 30'' și la 3 minute după adăugarea serului (Ext. la 3' — Ext. la 30'')  $\times 2\ 000 = \text{unități/minut/ml ser}$

Valori normale: 2—60 U/ml.

Valori crescute: în infarct miocardic în a 2—3-a zi de la debut. Revine la normal către a 8-a zi.

După unii autori valori crescute s-ar observa și în: necroza hepatocelulară, carcinom metastatic, cetoza diabetică, tromboză cerebrală, mononucleoză infecțioasă.

### III. Determinarea activității izocitric dehidrogenazei (ICDH)

Enzima izocitric dehidrogenaza catalizează dehidrogenarea izocitratului în prezența NADP și Mn<sup>2+</sup>, rezultând oxoglutarat + NADPH + CO<sub>2</sub> + H<sup>+</sup>.

Metoda de dozare se bazează pe măsurarea vitezei de formare a NADPH care prezintă un maximum de adsorbție la  $\lambda = 340\text{ m}\mu$ .

*Reactivi:*

— tampon tris 0,1 M pH = 7,4

— clorură de mangan 0,01 M pH = 7,4



- izocitrat de sodiu 0,1 M
- NADP 0,001 M.

*Modul de lucru:* în cuva spectrofotometrului se pipetează:

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| — tampon tris .....        | 1,80 ml |
| — clorură de mangan .....  | 0,30 ml |
| — izocitrat de sodiu ..... | 0,10 ml |
| — NADP .....               | 0,40 ml |
| — ser .....                | 0,40 ml |

Se agită. Se citește extincția imediat (la 3 secunde și la 3 minute după adăugarea serului).

$$\text{U.ICDH/minut/ml ser} = (\text{Extincția 3 minute} - \text{extincția 3 secunde} \times 2500)$$

*Valori normale:*

pină la 10 U.ICDH/minut/ml ser.

#### Determinarea activității glutamic dehidrogenazei (GLDH)

Enzima catalizează descompunerea glutamatului în prezența NAD rezultând  $\alpha$ -cetoglutarat + NADH +  $\text{NH}_3$ . Metoda se bazează pe măsurarea vitezei de formare a NADH care prezintă un maximum de absorbție la  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ .

*Reactivi:*

- tampon tris 0,1 M pH = 7,5
- $\text{MgSO}_4$  2,4 g%
- glutamat de sodiu 0,1 M pH = 7,5
- NAD 3 mg/ml.

*Modul de lucru:* în cuva spectrofotometrului se pipetează:

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| — tampon TRIS .....       | 1,5 ml  |
| — $\text{MgSO}_4$ .....   | 0,1 ml  |
| — glutamat de sodiu ..... | 0,15 ml |
| — NAD .....               | 1,0 ml  |
| — ser .....               | 0,25 ml |

Densitatea optică se măsoară la  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$  la 30 secunde și la 3 minute de la adăugarea serului.

*Calcul:*

$$(\text{Ext. } 3' - \text{Ext. } 30'') \times 4000$$

Valori normale: 30—50 U.GLDH/minut/ml ser.

#### Determinarea activității malic dehidrogenazei (MDH)

Enzima catalizează dehidrogenarea malatului în prezența NAD rezultând oxalacetat + NADH +  $\text{H}^+$ . Dozarea se bazează pe măsurarea vitezei de formare a NADH care prezintă un maximum de adsorbție la  $\lambda = 340 \text{ m}\mu$ .

*Reactivi:*

- tampon glicocol M pH = 9
- malat de potasiu M pH = 7,5
- NAD 3 mg/ml

**Modul de lucru:** în cuva spectrofotometrului se pipetează:

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| — tampon glicocol .....  | 0,1 ml |
| — malat de potasiu ..... | 0,2 ml |
| — NAD .....              | 2 ml   |
| — ser .....              | 0,2 ml |

Densitatea optică se citește la  $\lambda = 340$  m $\mu$  la 30 secunde și 3 minute de la adăugarea serului.

**Calcul:**

$$(\text{Ext. } 3' - \text{Ext. } 30'') \times 2\,000$$

Valori normale: 50—2 000 U/minut/ml ser.

Activitatea malicdehidrogenazei serice este crescută în special în cazurile de infarct miocardic și necroza hepatocelulară.

**Determinarea activității enzimatiee a succin-dehidrogenazei (SDH)**

Metoda de dozare se bazează pe măsurarea vitezei de reducere a ferici-anurii de potasiu în ferocianură de potasiu care se traduce printr-o scădere a extincției la lungimea de undă = 400 m $\mu$ .

SDH nu necesită prezența coenzimelor NAD și NADP.

Enzima succindehidrogenaza catalizează dehidrogenarea succinatului în fumarat în prezența fericianurii de potasiu. Acceptorul hidrogenului, respectiv al electronilor este sistemul citocromic care cedează protoni (H<sup>+</sup>) direct oxigenului molecular.

**Reactivi:**

- tampon fosfat 0,15 M pH = 7,2
- fericianură de potasiu 0,01 M
- cianură de sodiu 0,1 M pH = 7,5
- succinat de sodiu 0,2 M

**Modul de lucru:** în cuva spectrofotometrului se pipetează:

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| — tampon fosfat .....          | 2 ml   |
| — fericianură de potasiu ..... | 0,3 ml |
| — cianură de sodiu .....       | 0,3 ml |
| — succinat de sodiu .....      | 0,2 ml |
| — ser .....                    | 0,2 ml |

Se citește la  $\lambda = 400$  m $\mu$  la 30 secunde și 3 minute după adăugarea serului.

**Calcul:** (ext. 3' — ext. 30'')  $\times$  5 000 = U/minut/ml ser

Valori normale:

50—100 U/minut/ml ser.



## INVESTIGAREA FUNCTIEI RENALE ȘI HEPATICE PRIN METODE SPECIALE. „CLEARANCE-URI”

### A. CLEARANCE-URI RENALE

„Clearance” noțiune introdusă de Van Slyke exprimă cantitatea de plasmă epurată de către rinichi în unitatea de timp pentru o substanță dată:

$$C = \frac{U \times V}{P \times}$$

C = clearance-ul substanței x;

U = concentrația substanței x în urină exprimată în mg% sau mg/ml;

V = debitul urinar ml/minut;

P = concentrația substanței x în plasmă exprimată în mg% sau mg/ml;

Se urmărește clearance-urile a două categorii mari de substanțe:

A. — Substanțe ce nu se reabsorb și nu se secretă de către tub. Clearance-ul acestor substanțe reprezintă filtratul glomerular.

B. — Substanțe ce sînt depurate complet. Clearance-ul acestora reprezintă fluxul plasmatic renal.

Pentru obținerea de rezultate reproductibile clearance-urile renale trebuie executate în condiții clinice și biochimice standardizate.

#### 1. — Condiții clinice:

a) Pregătirea bolnavului — repaus 12 ore.

b) Recoltarea urinei se realizează prin:

— micțiune spontană (cînd există certitudinea unei goliri perfecte a vezicii);

— cateterism vezical (executat în condiții speciale de asepsie);

— cateterism vezical și insuflare de aer urmată de aspirație (cu ajutorul unei seringi racordată la o sondă vezicală).

- c) Asigurarea unei diureze suficiente:
- diureza minimă pentru un clearance este de 1,5 ml/minut;
  - în cazul unei alterări renale ușoare, bolnavul trebuie să ingereze 400—500 ml apă în jumătate de oră;
  - în cazul unei insuficiențe renale grave se hidratează pînă la 10 ml/kg corp sau 500 ml/m<sup>2</sup> de suprafață corporală.

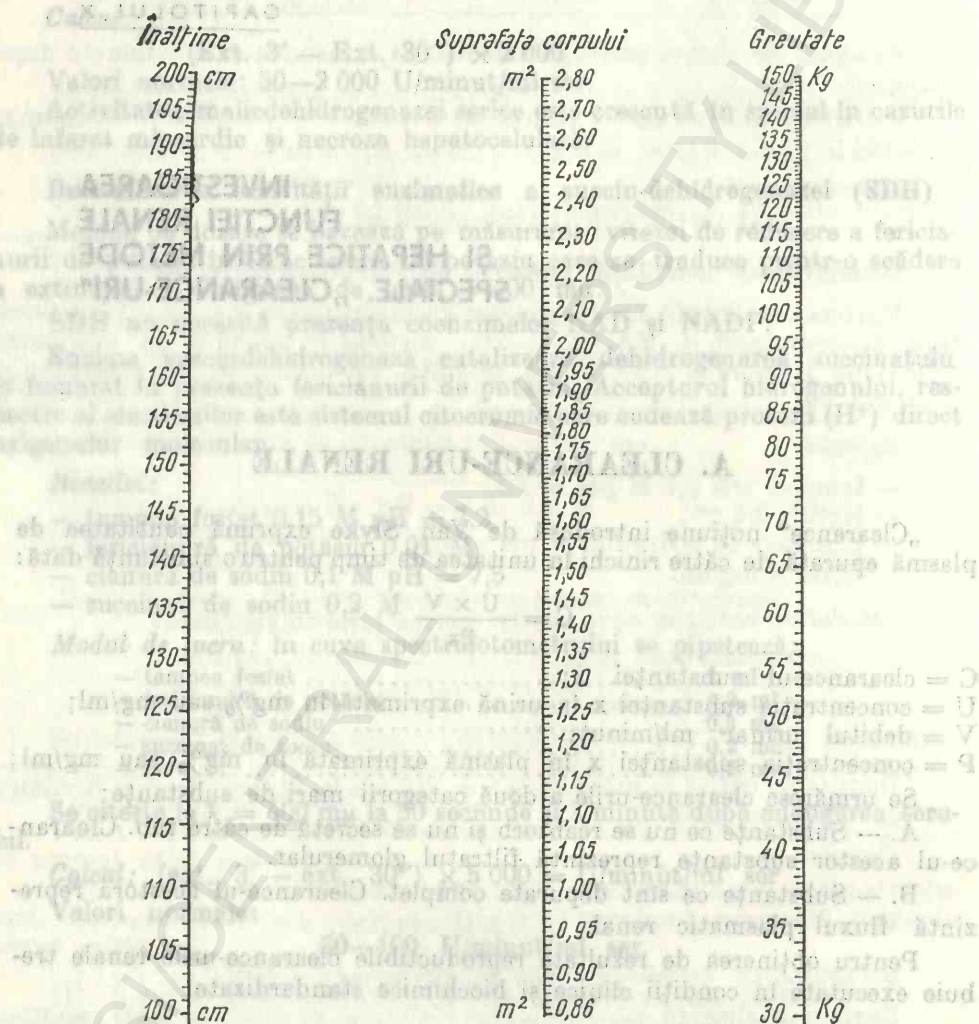


Fig. 39. — Nomograma pentru determinarea suprafeței corpului.

Suprafața corporală a bolnavului se calculează după nomograma lui Van Slyke (fig. 39); nomograma are trei coloane. Pe coloana din stînga figurează înălțimea în cm, pe cea din dreapta greutatea în kg, iar pe cea mediană suprafața corporală în m<sup>2</sup>.



Pentru determinarea suprafeței corporale se unește cu o riglă punctul de pe coloana din stînga care indică înălțimea bolnavului cu punctul de pe coloana din dreapta care indică greutatea.

În locul unde coloana mediană intersectează linia de racord se citește suprafața corporală în  $m^2$ . Odată determinată suprafața corporală (SC) a subiectului se calculează factorul de corecție (F.C.) al clearance-ului făcînd raportul între SC standard 1,73 și cea calculată.

$$EC = 1,73/SC$$

Cu acest factor se multiplică valoarea clearance-ului găsit experimental.

## 2. — Condiții biochimice:

a) substanțele folosite pentru determinarea funcției renale trebuie să prezinte toleranță absolută din partea organismului;

— să fie total filtrabile la nivelul glomerulului (deci cu greutate moleculară mică);

— să fie prezente în plasmă sub formă liberă, să nu fie legate de proteine;

— să nu fie toxice pentru organism;

— să nu fie secretate sau reabsorbite la nivelul tubilor renali;

— să fie ușor dozabile;

— metoda folosită să fie simplă și precisă.

Substanțele folosite în acest scop sînt: creatinina, ureea, inulina, manitolul și tiosulfatul.

Dintre acestea creatinina și ureea sînt substanțe endogene.

Creatinina are o concentrație plasmatică și urinară constantă, iar determinările de laborator fiind ușor de realizat, clearance-ul de creatinină endogenă a devenit o metodă clinică de mare rutină; în prezent se tinde spre folosirea testelor cu radioizotopi.

Dintre clearance-urile efectuate cu substanțe exogene sînt: inulina, manitolul, tiosulfatul.

*Clearance-ul de inulină* este considerat ca proba de referință pentru filtrarea glomerulară.

În cele ce urmează, dăm metodele de lucru pentru executarea diferitelor clearance-uri.

## CLEARANCE-UL CREATININEI ENDOGENE

Principiul metodei constă în determinarea creatininei în sînge și urină, concomitent cu măsurarea debitului urinar într-un timp limitat.

*Modul de lucru:* în dimineața efectuării probei bolnavul este reținut la pat conform indicațiilor generale. O jumătate de oră înainte de începerea testului pacientul bea o cantitate de apă echivalentă cu 10 ml/kg corp după ce își golește vezica prin una din metodele indicate (miețiune spontană prin ridicarea pacientului la verticală sau prin cateterism vezical). Acest moment este timpul de la care se cronometrează începerea probei. În două etape consecutive de una sau două ore bolnavul își golește din nou vezica tot prin același procedeu ca la început. Probele de urină se notează cu  $U_1$  și  $U_2$ . În cazul în care diureza nu este suficientă pentru efectuarea probei bolnavul este obligat să mai bea circa 200—300 ml apă.

Proba de singe (notat cu P) pentru creatinina endogenă se poate recolta fie la începutul clearance-ului, fie la jumătatea intervalului între două perioade de colecție a urinei, întrucât această componentă este o constantă pentru organism minimum 24 ore.

Pentru calculul clearance-ului se determină valoarea creatininei urinare în probele  $U_1$  și  $U_2$  și valoarea creatininei sanguine în proba P.

Se măsoară cu precizie volumele urinelor  $U_1$  și  $U_2$  din care se calculează debitul urinar exprimat în ml/minut notate cu  $V_1$  și  $V_2$ .

Aceste date se introduc în formula de calcul:

$$C = \frac{U \times V}{P}$$

în care:

C = coeficientul de epurație (clearance);

$U_1$  și  $U_2$  = concentrația de creatinină în probele de urină  $U_1$  și  $U_2$  exprimate în mg% sau mg/ml;

$V_1$  și  $V_2$  = debitele urinare corespunzătoare urinelor  $U_1$  și  $U_2$ , obținute prin diviziunea volumului urinei exprimat în ml la timpul scurs între două goliri succesive ale vezicii urinare;

P = valoarea creatininei sanguine exprimată în mg% sau mg/ml.

Între cele două perioade de clearance se face media. În cazul unei efectuări corecte diferența dintre clearance-urile 1 și 2 nu trebuie să depășească 10 ml/minut.

Valorile normale pentru clearance-ul creatininei endogene sînt de:  $130 \pm 15$  ml/minut.

Avantajul metodei constă în faptul că valorile ce se obțin sînt independente de aportul exogen de proteine și de diureză.

Valorile clearance-ului glomerular prezintă o scădere în funcție de vîrstă.

### CLEARANCE-UL DE UREE

Ureea, substanță endogenă, reflectă în mare, valoarea filtratului glomerular, cu toate că cifrele fiziologice furnizate de acest clearance sînt numai de 75 ml/minut. Această scădere a valorii normale se datorește procesului de retrodifuziune pe care-l suferă ureea la nivelul tubilor renali. Retrodifuziunea ureei este cu atît mai marcată cu cît debitul urinar este mai mic. De aceea, în cazul clearance-ului de uree se recomandă ca debitul urinar să fie mai mare de 2 ml/minut. Procedul tehnic de execuție este același ca în cazul creatininei endogene.

În cazul unei azotemii datorate unei hiperproducții sau deshidratări se recomandă următorul procedeu:

Hidratarea bolnavului începe din seara care precedă explorarea. Odată cu cina, bolnavul bea ceai neîndulcit sau apă 600 ml pe  $m^2$  de suprafață corporală.

Dimineata, fără să primească micul dejun bea 500 ml apă. În perioada de explorare el poate bea încă, în funcție de necesarul asigurării unei diureze suficiente.



După hidratarea de dimineată, bolnavul urinează golind perfect vezica. Se execută apoi două perioade de clearance la interval de 2—3 ore, cronometrind exact timpul între două micțiuni. La jumătatea intervalului se ia o priză de sînge.

*Modul de lucru:* se procedează întocmai ca la clearance-ul de ceatinină endogenă.

Se determină concentrația urinară în probele  $U_1$  și  $U_2$  și în proba de sînge P prin aceeași metodă.

Se calculează debitele urinare  $V_1$  și  $V_2$ .

*Calcul:*

Datele obținute se introduc în formula:

$$C = \frac{U \times V}{P}$$

Se face media celor două perioade de clearance și apoi corecția în funcție de suprafața corporală a bolnavului.

Valoarea normală este de 75 ml/minut.

Se obișnuiește ca rezultatul să fie exprimat în procente față de valoarea fiziologică medie de 75 ml/minut.

$$\text{Procente din valoarea fiziol.} = \frac{C_{\text{max.}} \times 100}{75} = C_{\text{max.}} \times 1,33$$

În cazul în care debitul urinar este mai mic de 1,5 ml/minut, se calculează coeficientul standard conform formulei:

$$\text{Coeficient standard} = \frac{U \times \sqrt{V}}{P}$$

Valoarea normală este de 54,5 ml/minut.

Pentru ușurarea calculului valorile  $\sqrt{V}$  sint date în tabelul XCI.

Tabelul XCI

Calculul radicalului

| $\frac{V}{\text{ml/min.}}$ | $\sqrt{V}$ | $\frac{V}{\text{ml/min.}}$ | $\sqrt{V}$ | $\frac{V}{\text{ml/min.}}$ | $\sqrt{V}$ | $\frac{V}{\text{ml/min.}}$ | $\sqrt{V}$ |
|----------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|------------|
| 0,2                        | 0,45       | 0,7                        | 0,84       | 1,2                        | 1,10       | 1,7                        | 1,30       |
| 0,3                        | 0,55       | 0,8                        | 0,89       | 1,3                        | 1,14       | 1,8                        | 1,34       |
| 0,4                        | 0,63       | 0,9                        | 0,95       | 1,4                        | 1,18       | 1,8                        | 1,38       |
| 0,5                        | 0,71       | 1,00                       | 1,00       | 1,5                        | 1,23       | 2,0                        | 1,12       |
| 0,6                        | 0,78       | 1,1                        | 1,05       | 1,6                        | 1,37       | 2,1                        | 1,45       |

Rezultatele se pot exprima și în procente față de valoarea fiziologică medie care este 54,5.

$$\text{Coeficient standard \%} = \frac{\text{Coeficient standard} \times 100}{54,5} = \text{Coeficient standard} \times 1,85.$$

Întrucît interpretarea clinică a acestor date este dificilă, s-a renunțat la efectuarea coeficientului standard.

Clearance-ul de creatinină și uree se poate executa și pe perioada de 24 ore. În această situație se respectă întocmai indicațiile menționate avînd grijă ca bolnavul să fie bine hidratat astfel ca nefronii să funcționeze la maximum de capacitate și să asigure o diureză suficientă. Se recoltează o singură probă de singe pentru creatinină și uree dimineata, iar probele de urină sînt colectate în totalitate pe conservant (soluție timol 10% în izopropanol).

## PROBA ROMEO

Această probă constă în efectuarea simultană a clearance-urilor de creatinină și uree și permite investigarea separată atît a glomerulului cît și a tubului renal.

Hidratarea bolnavului începe din seara care precedă explorarea. Dimineata „à jeun” goleşte vezica, se aruncă urina și bea 500 ml apă sau ceai foarte puțin dulce. După 50 minute se recoltează singe. La 100 minute de la ingerarea de apă și la 50 minute de la recoltarea singelui se colectează toată urina. Reducerea manoperelor la o singură recoltare de singe și de urină face ca proba Romeo să fie preferată față de clearance-urile de creatinină și uree.

*Modul de lucru:*

În probele recoltate se dozează:

- creatinina în singe;
- creatinina în urină,
- ureea în singe,
- ureea în urină.

*Calculul constantelor renale:*

$$\text{— debitul urinar (U}_h\text{)} = \frac{V \times 60}{100 \times 100};$$

V = volumul total de urină recoltat din și la 100 minute de la ingerarea apei.

Se calculează următoarele constante:

I. Suprafața glomerulară activă ( $S_{GA}$ ) =  $\frac{U_h \times Cu}{Cs} = l/h$

$U_h$  = debitul urinar în l/oră

$Cu$  = creatinină urinară

$Cs$  = creatinină sanguină

Talon normal 5—8 l/h

II. Capacitatea tubulară de excreție a ureei

$$(CTEU) = \frac{U_h \times U_u \times 100}{U_s \times SGA} \text{ l/h}$$

$U_h$  = debit urinar în l/h

$U_u$  = uree urinară g/l

$U_s$  = uree sanguină g/l

Valori normale = 25—30 %.



III. Indicele de diureză tubulară (IDT) =  $\frac{U_h \times 100}{SGA} = \%$

Valori normale = 3%.

IV. Indicele renal (IR) =  $\frac{C_u}{U_u \times 100} = \%$

Valori normale = 0,09 — 0,12 %.

### CLEARANCE-UL SUBSTANTELOR EXOGENE PENTRU DETERMINAREA VALORII FILTRATULUI GLOMERULAR

Pentru estimarea valorii filtratului glomerular clearance-ul de inulină este considerat ca probă de referință. În general se efectuează simultan cu cel de PAH care dă indicații asupra fluxului plasmatic renal sau a fluxului sanguin renal.

În aceste cazuri se cere:

- 1) Menținerea constantă a concentrației sanguine prin perfuzie continuă.
- 2) Sondarea bolnavului cu spălarea vezicii.
- 3) Prelevări repetate de sânge încadrate de cele de urină.

### CLEARANCE-UL GLOMERULAR CU INULINĂ (vezi addendum)

### CLEARANCE-UL SIMULTAN DE INULINĂ ȘI PAH

Se păstrează întocmai toate condițiile indicate pentru efectuarea oricărui clearance.

Se controlează ca bolnavul să nu fie sub tratament cu diuretice sau sulfonamide cu efect prelungit. Este necesar ca un astfel de tratament să fie întrerupt cel puțin cu trei zile înainte de efectuarea probei.

*Modul de lucru:*

*Perfuzia I:*

În decurs de 15—20 minute se injectează bolnavului o cantitate de 40 ml soluție inulină 10% și 3 ml soluție PAH 20% diluate la 100 ml cu ser fiziologic. Această perfuzie are drept scop de a aduce plasma la concentrația dorită.

*Perfuzia II-a:*

Se diluează 25 ml inulină (10%) și 5 ml PAH 20% cu ser fiziologic pînă la 200 ml (concentrațiile acestor perfuzii sînt calculate pentru o suprafață corporală de 1,73 m<sup>2</sup>. În cazurile în care suprafața corporală a subiecților explorați diferă, concentrațiile acestor perfuzii trebuie modificate proporțional cu suprafața lor corporală).

În caz că prin investigațiile anterioare sînt suspiciuni pentru insuficiența renală concentrația perfuziei a II-a trebuie modificată proporțional cu starea de alterare a funcției renale.

*Modul de lucru:*

1. Înainte de începerea probei, se golește vezica prin cateterism și spălare cu apă. Aceasta constituie proba martor de urină, notată cu U<sub>0</sub>.

2. — Se prevelează circa 5 ml sînge pe heparină care constituie proba  $P_0$ .
3. — Prin aceeași punctie venoasă se introduce perfuzia I în timp de 10—15 minute.
4. — Se continuă cu perfuzia II, primii 30 ml cu același debit, apoi cu un debit de 4 ml/minut.
5. — La 20 minute de la începutul perfuziei II se evacuează vezica spălînd-o de 2 ori cu apă. Acesta este momentul de început al clearance-ului. Perioada durează 15 minute.
6. — La 7 minute, de la golirea vezicii se ia o priză de sînge din celălalt braț printr-un ac heparinizat și proba se notează cu  $P_1$ .
7. — Exact la 15 minute de la punctul O se golește vezica din nou prin același procedeu ca mai sus și se obține urina  $U_1$ .
8. — Se repetă operațiile de la punctul 6, 7 și probele se notează respectiv cu  $P_2$  și  $U_2$ .
9. — Se calculează debitul urinar în probele  $U_1$  și  $U_2$  scăzînd din volumul total apa utilizată la spălarea vezicii și divizînd cu 15 volumul emis.
10. — Se dozează inulina și PAH-ul în probele de urină  $U_0$ ,  $U_1$  și  $U_2$  și probele de sînge  $P_0$ ,  $P_1$ , și  $P_2$ .
11. — Se scad valorile  $U_0$  și  $P_0$  din probele  $U_1$  și  $U_2$ , respectiv  $P_1$  și  $P_2$ .
12. — Se calculează clearance-ul după formula:

$$C_{In} = \frac{U_{In} \cdot V}{P_{In}} ; \quad C_{PAH} = \frac{U_{PAH} \cdot V}{P_{PAH}}$$

13. — Se face media celor două perioade de clearance atît pentru inulină cît și pentru PAH.

14. — Se corectează valoarea estimată experimental față de suprafața corporală a bolnavului după cum s-a mai arătat.

Clearance-ul de inulină indică valoarea filtratului glomerular avînd valoarea fiziologică de:

— bărbați:  $125 \pm 20$  ml/minut

— femei:  $110 \pm 15$  ml/minut

Clearance-ul de PAH reprezintă fluxul plasmatic efectiv cu valori fiziologice de:

— bărbați:  $650 \pm 150$  ml/minut

— femei:  $570 \pm 120$  ml/minut

Raportul între filtrarea glomerulară dată de clearance-ul de inulină ( $C_{In}$ ) sau de creatinină endogenă ( $C_{Cr}$ ) și fluxul plasmatic efectiv, dat de clearance-ul de PAH, multiplicat cu 100, reprezintă valoarea fracției filtrate (FF).

$$FF = \frac{C_{In}(C_{Cr})}{C_{PAH}} \cdot 100$$

Această expresie are valori normale cuprinse între 18—22 și este un bun indicativ atît pentru evidențierea leziunilor glomerulare cît și a celor tubulare.

$FF < 18$  — leziuni glomerulare

$FF > 22$  — leziuni tubulare



## DETERMINAREA INULINEI (TESTUL CU ANTRONĂ)

(Plasmă, ser, urină) (după R. Richterich)

### Reactivi:

1. — Acid tricloracetic 10%

2. — Reactiv antronă

Se dizolvă cu grijă 500 ml acid sulfuric concentrat în 130 ml apă demineralizată. Se dizolvă în această soluție 0,5 g antronă (recristalizată de două ori în acid acetic glacial).

Soluția este stabilă două zile în flacon brun la +4°C.

3. — Standard de inulină 5 mg% ml.

Se dizolvă soluția comercială de inulină cu acid tricloracetic 10% pentru a obține concentrația dorită (stabilă la temperatura ambiantă).

### Modul de lucru:

#### Deproteinizarea:

a) La 0,2 ml ser sau plasmă se adaugă 2 ml acid tricloracetic prin agitare puternică. Se centrifughează

b) La 0,2 ml urină se adaugă 20 ml acid tricloracetic 10%.

În trei eprubete se pipetează:

|                               | Probă (P) | Blanc (B) | Standard (S) |
|-------------------------------|-----------|-----------|--------------|
| reactiv antronă               | 2 ml      | 2 ml      | 2 ml         |
| plasmă, ser sau urină diluată | 0,2 ml    | —         | —            |
| acid tricloracetic            | —         | 0,2 ml    | —            |
| standard 5 mg/ml              | —         | —         | 0,2 ml       |

Notă: diluția urinei și tehnica de dozare se efectuează în eprubete gradate.

Probele astfel pregătite se țin 50 minute în baie de apă la 37° și apoi încă 15 minute la temperatura laboratorului, după care se citește extincția la  $\lambda = 630 \text{ m}\mu$ , față de apă, în cuva de 1 cm.

### Calcul:

Plasmă sau ser:

$$\text{mg \% ml} = \frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \times 55$$

Urină:

$$\text{mg \% ml} = \frac{E_P - E_B}{E_S - E_B} \times 505$$

Nu se poate aplica metoda când glicemia depășește 200 mg % ml.

## CLEARANCE-URILE DE MANITOL ȘI TIOSULFAT DE SODIU

Aceste clearance-uri se utilizează din ce în ce mai puțin datorită gradului scăzut de toleranță la foarte mulți bolnavi.

Determinarea para-amino-hipuratului de sodiu

Brottan (A.C.) și Marshall (E.K.) (Plasmă, ser urină)

### Reactivi:

1. soluție sulfat de cadmiu:  
sulfat de cadmiu ( $\text{Cd SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) 17,34 g  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$  N ..... 84,55 ml  
apă pină la ..... 500 ml.
2. soluție sulfamat de amoniu 0,5%
3. soluție  $\text{NaNO}_2$  0,1% (preparată zilnic)
4. soluție sulfamat de amoniu 0,5%
5. clorhidrat (1 naftil etilen diamină) 0,1%
6. acid clorhidric 1,2 N
7. soluție etalon p-amino hipurat de Na 1 mg% ml

### Modul de lucru:

#### Deproteinizarea:

Într-un balon se pipetează:

|                                                    |       |
|----------------------------------------------------|-------|
| — $\text{Cd SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ..... | 6 ml  |
| — apă distilată .....                              | 20 ml |
| — plasmă, ser .....                                | 2 ml  |
| (pt. urină se face o diluție 1/500—1/2000)         |       |
| — NaOH N .....                                     | 2 ml  |

Se agită puternic. Repaus 10 minute. Centrifugare sau filtrare.

|                                         | Probă | Martor |
|-----------------------------------------|-------|--------|
| — filtrat plasmatic sau urină diluată   | 10 ml | —      |
| — apă                                   | —     | 10 ml  |
| — HCl 1,2 N                             | 2 ml  | 2 ml   |
| — $\text{NaNO}_2$                       | 1 ml  | 1 ml   |
| — sulfamat de amoniu                    | 1 ml  | 1 ml   |
| — clorhidrat de 1 naftil etilen diamină | 1 ml  | 1 ml   |

După fiecare reactiv se agită și se lasă proba în repaus 2 minute.

Citirea se face la  $\lambda = 540 \text{ m}\mu$  față de soluția martor, cuvă 1 cm.

Intensitatea probei este raportată la curba etalon obținută cu cel puțin 3 diluții din soluția etalon de PAH.

Calcul singe:

mg% ml singe (Valoarea de pe curbă)  $\times 0,83 \times 3 \times 50$

Calcul urină:

mg % ml urină (valoarea de pe curbă)  $\times$  diluția  $\times 10$ .

Valori normale:

550—800 ml/minut la bărbați

480—700 ml/minut la femei.

În paralel cu clearance-ul substanțelor exogene—inulina—pentru estimarea valorii filtratului glomerular se execută și clearance-ul de PAH la slabe concentrații plasmatice.

### CLEARANCE-UL DE PAH

Perfuzia de PAH se execută simultan cu cea de inulină. Prin determinarea clearance-ului de PAH la concentrații plasmatice mai mici de 5 mg%, se obține fluxul plasmatic efectiv.



Limitele fiziologice pentru fluxul plasmatic sînt:

bărbați:  $650 \pm 150$  ml/minut

femei:  $570 \pm 120$  ml/minut

Raportul între filtrarea glomerulară dată de clearance-ul de inulină ( $C_{In}$ ) sau creatinină endogenă ( $C_r$ ) și fluxul plasmatic, dau valoarea fracției filtrate (FF):

$$FF = \frac{C_{In} (C_r)}{C_{PAH}} \times 100$$

Valorile normale ale fracției filtrate:

$$FF = 18-22.$$

Leziunile glomerulare cunosc valori mult scăzute sub aceste cifre.

## PROBE PENTRU CONTROLUL FUNCȚIEI TUBULARE

### 1. — Excreția tubulară

*Proba cu roșu de Congo*

*Principiu:* dacă se injectează roșu de Congo intravenos, colorantul este fixat de țesutul amiloid și apare o scădere remarcabilă a concentrației lui în ser.

*Reactivi:*

roșu de Congo.....fiole cu soluție sterilă .....1g%.

*Modul de lucru:*

Se recoltează bolnavului 10 ml sînge pe nemîncate. După ce golește vezica complet i se injectează 10 ml soluție sterilă de roșu Congo 1%. După 3 și 60 minute se recoltează 10 ml sînge. După 60 minute se golește din nou vezica.

Se citește la fotometru  $\lambda = 525$  m $\mu$  extincția  $E_1$  a serului recoltat după 3 minute și extincția  $E_2$  a serului recoltat după 60 minute, martorul este serul recoltat înainte de probă.

*Calcul:*

Scăderea procentuală a colorantului în ser este dată de formula:

$$x\% = 100 \times \frac{E_1 - E_2}{E_1}$$

*Interpretare:* în mod normal scăderea colorantului este de 15—35%. Valori între 35—65% se întîlnesc atît în nefroza lipoidă cît și în cea amiloidă. Valori peste 65% traduc o amiloidoză.

În mod normal a 2-a probă de urină este net colorată, în amiloidoză această probă nu este deloc sau numai foarte puțin colorată.

### 2. Reabsorbția tubulară

*Reabsorbția spontană*

A fost studiată îndeosebi pentru apă și electroliți. Ea dă indicații prețioase în ceea ce privește starea anatomică și funcțională a celulei renale.

În mod practic se execută concomitent cu clearance-ul de creatinină endogenă determinând în fiecare probă de sînge și urină cantitatea de electroliți pe care vrem s-o cercetăm. Reabsorbția apei se calculează ușor, fiind dată de valoarea filtratului glomerular (ml/minut), din care se scade diureza/minut în timpul aceleiași perioade:

$$R\% = \frac{F_{GCr} - V}{F.G.Cr} \times 100 \text{ în care:}$$

R = reabsorbția

$F_{GCr}$  = filtrarea glomerulară prin clearance-ul de creatinină.

V = debitul urinar/ml/minut.

Valorile normale pentru reabsorbția apei exprimate în procente sînt cuprinse între 98—99,2%.

În același mod prin diferența între cantitatea filtrată de glomeruli și cantitatea excretată în urină se poate calcula reabsorbția de electroliți. Pentru calcul se aplică formula:

$$R_o\% = \frac{F_g \times P_o - U_o \times V}{F_g \times P_o} \times 100$$

În care:

$R_o$  este procentul de electroliți reabsorbit de tub;

$F_g$  este filtratul glomerular ml/minut;

$P_o$  este concentrația plasmatică a electrolitului în mg%;

V este diureza în ml/minut;

$U_o$  este concentrația urinară a electrolitului în proba de clearance exprimat în mg %.

### CLEARANCE-UL DE IONI

Aplicînd formula indicată de Van Slyke se poate calcula clearance-ul oricărei substanțe atît timp cît avem posibilitatea de a cunoaște concentrația ei plasmatică și debitul urinar. În modul acesta s-a putut calcula clearance-ul tuturor electroliților. Interes clinic deosebit prezintă clearance-ul de fosfați și de potasiu. Clearance-ul de fosfați are valoare fiziologică cuprinsă între 6—15 ml/minut, fiind crescut în osteomalacie și hiperparatiroidism și scăzut în toate formele de insuficiență renală și hipoparatiroidism. Clearance-ul de potasiu este executat în general în urină de 24 ore. Valorile normale sînt cuprinse între 8—12 ml/minut.

Prezintă interes în cazurile de hipokaliemii grave. Alături de clearance-ul de electroliți trebuie citat și cel de osmolari care reprezintă clearance-ul tuturor substanțelor dizolvate în plasmă și care sînt osmotice active. Deși prezintă interes clinic deosebit sînt greu de realizat deoarece osmolaritatea plasmatică și urinară se determină prin crioscopie. Dacă din diureză se scade clearance-ul de osmolari se obține valoarea apei libere generată de filtratul glomerular.



## METODE DE EXPLORARE A FUNCȚIEI RENALE FĂRĂ CLEARANCE

Proba de diureză provocată (J. Cottet) este foarte simplă, iar rezultatele sînt satisfăcătoare pentru depistarea alterărilor tubulare.

**Modul de lucru:** subiectul explorat își golește vezica seara la culcare. Dimineata urinează din nou peste urina colectată în timpul nopții. Această urină corespunde perioadei nocturne. Imediat după golirea vezicii în timp de 15 minute bea 600 ml apă și rămîne culcat la pat tot timpul explorării. Se recoltează urina timp de 5 ore din oră în oră. În fiecare eșantion se determină volumul exprimat în ml/minut și densitatea. Un subiect normal elimină în mod obișnuit în primele 2 ore o cantitate egală sau mai mare de urină față de lichidul ingerat. Volumul urinei crește considerabil în raport cu urina nocturnă. În același timp densitatea scade uneori sub 1003.

În insuficiența renală, în special în alterările tubulare, rezultatele sînt deosebite. Ingestia apei nu influențează prea mult debitul urinar, iar densitatea suferă mici variații. Această probă poate fi influențată de o serie de factori extrarenali ca: ciroza, insuficiența suprarenalelor, insuficiența cardiacă etc.

— Nu se poate aplica în cazul glicozuriei și poliuriei datorită modificărilor de densitate.

— Nu se poate aplica în cazul prostatitelor și edematoșilor datorită eliminărilor urinare inexacte.

— Nu se poate aplica la uremici deoarece ingestia unei cantități mari de apă produce vomisme.

### Testul cu fenolsulfonftalein (PSP)

PSP-ul este excretat rapid prin tubii renali în proporție de 94—95%. Eliminările de colorant în interval de 15 minute sînt considerate ca măsură pentru excreția tubulară.

#### Reactivi:

1. — Soluție injectabilă PSP 6 mg/10 ml (soluție sterilă)
2. — NaOH ..... 2 g%
3. — Acid acetic glacial.

#### Modul de lucru:

1. — Bolnavul este ținut la pat minimum 20 minute înainte de începerea probei, apoi este obligat să-și golească complet vezica.

2. — După golirea vezicii pacientul bea 600—1 000 ml de ceai neîndulcit.

3. — La aproximativ 45 minute se injectează intravenos exact 10 ml de PSP (soluția 1).

4. — Fix la 15 minute după injecție pacientul trebuie să-și golească perfect vezica.

5. — Se transvazează urina într-un cilindru gradat de 500 ml și se aduce la semn cu apă distilată.

|                  | Probă  | Blanc  | Standard |
|------------------|--------|--------|----------|
| urină diluată    | 10 ml  | 10 ml  | —        |
| soluție standard | —      | —      | 10 ml    |
| NaOH 20%         | 2 pic. | —      | 2 pic.   |
| acid acetic      | —      | 2 pic. | —        |

Se agită și se colorimetrează la  $\lambda = 545 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm.

Se măsoară adsorbția față de blanc și adsorbția standardului față de apă distilată. (În cazul cînd prin diluare sau la adaosul de NaOH, apare o opalescență, se centrifughează proba și se fotometrează supernatantul).

*Calcul:*

$$\frac{E_p}{E_s} \times 50 = \% \text{ extincție PSP}$$

Valori normale:

35—45 % PSP excretat.

Excreția scade cu vîrsta astfel încît între 50—60 ani excreția de PSP este 30% și peste 60 ani excreția de PSP este 25%.

*Interpretare:* la subiecții normali proporția de PSP excretată este în medie de 40%. Abateri de la aceste valori traduc alterări reversibile sau ireversibile ale mecanismului excretor din celulele tubulare, sau un aport modificat de colorant, consecutiv modificării fluxului plasmatic renal.

Este de remarcat că eliminarea de PSP este influențată și de o serie de factori extrarenali ca: insuficiență cardiacă, leziuni hepatice și febră.

★

Metode greu de aplicat în executarea clearance-urilor ca și incertitudinea în determinarea debitului urinar au condus la elaborarea unor tehnici noi de lucru atît pentru evaluarea filtratului glomerular cît și a fluxului renal.

Aceste clearance-uri intitulate „clearance-uri indirecte” constau în determinarea timpului de înjumătățire și scăderea concentrației plasmatice a unei substanțe injectate.

Ele vor înlocui cu timpul complet metodele clearance-urilor clasice denumite „metode speciale” pentru investigarea funcției renale“.

## B. CLEARANCE-URI HEPATICE

(vezi „Addendum“).



## lichidul cefalorahidian (LCR)

Recoltarea LCR-ului se execută pe nemîncate, prin puncție lombară sau suboccipitală în mod steril.

Se extrag 10–20 ml lichid, se apreciază în primul moment tensiunea sub care se află lichidul cefalorahidian și apoi se trece la efectuarea examenelor macroscopice, microscopice, chimice și bacteriologice.

**Tensiunea LCR** se determină cu manometrul Claude. În stare normală tensiunea este egală cu 12–15 mm apă.

În hipertensiunea intracraniană presiunea este de 30–50 mm apă.

La copii mici măsurarea tensiunii nu are valoare din cauza efortului de plîns care mărește tensiunea.

**Examenul macroscopic.** Lichidul cefalorahidian în mod normal este limpede, incolor, transparent, cu densitate 1002–1008, iar prin agitare nu produce spumă. În stări patologice poate fi tulbure și colorat în galben verzui datorită bilirubinei sau în roșu datorită singelui, sau poate fi purulent.

Densitatea LCR se determină cu un areometru special (mic).

**Examenul chimic** se face pe lichid cefalorahidian centrifugat care nu trebuie să conțină singe. Dacă totuși conține singe se centrifughează la turație mare și se interpretează rezultatele cu rezervă.

pH-ul LCR este de 7,25–7,45.

## DETERMINAREA PROTEINELOR

Dozarea proteinelor în LCR se face cu metode calitative și cantitative rapide care constau în precipitarea proteinelor cu soluții de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , fenol, sau acizi precum și cu metode colorimetrice, metode ce sînt identice cu cele folosite în cazul dozărilor de proteine în serul uman.

În mod normal LCR conține 10–30 mg proteine % ml, dintre care 3/4 sînt albumine iar 1/4 globuline.

În cazuri patologice și anume în inflamații acute cresc albuminele, pe cînd în cele cronice cresc globulinele.

În general proteinorahia este crescută în toate afecțiunile inflamatorii ale sistemului nervos.

## 1) Reacția Pandy

**Principiu:** soluția saturată de fenol cu lichidul cefalorahidian, a cărui concentrație de proteine depășește o anumită limită, dă o precipitare.

**Reactivi:** soluția saturată de fenol:

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| fenol cristalizat ..... | 10 g   |
| apă distilată .....     | 100 ml |

Se lasă 24 ore la termostat apoi 3—4 zile la temperatura laboratorului. Supernatantul se decantează cu atenție și este folosit ca reactiv.

**Modul de lucru:** într-o sticlă de ceas așezată pe o hîrtie neagră se pune 1 ml soluție saturată de fenol. Cu o pipetă Pasteur se adaugă la marginea reactivului 2 picături de lichid cefalorahidian.

**Rezultate:**

- lichid clar sau ușor opalescent = lichid normal,
- opalescență slabă — slab pozitiv ( $\pm$ ),
- tulburare intensivă = pozitiv (+),
- tulburare lăptoasă = intens pozitiv (+++).

Reacția Pandy este pozitivă în: meningite, unele boli infecțioase (tifos, pneumonie), paralizia progresivă și tumori ale măduvei spinării. Deși reacția Pandy este foarte sensibilă, o reacție negativă nu exclude posibilitatea unei leziuni cerebrale pentru că pot exista cazuri de tumori cerebrale, encefalită sau leziuni nervos în care cantitatea de albumină este normală.

**Observații:** lichidul cefalorahidian nu trebuie să conțină sînge. Dacă totuși conține, se centrifughează la turație mare și se interpretează rezultatul cu rezervă.

## 2) Metoda Heller

**Principiul:** albuminele precipită cu acid nitric-nitros.

**Reactivi:** Acid nitric nitros

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| acid azotic .....     | 200 ml |
| apă distilată .....   | 100 ml |
| azotit de sodiu ..... | 0,06 g |

**Modul de lucru:**

— **Proba calitativă:** într-o eprubetă de hemoliză se pune 1 ml LCR iar cu o pipetă Pasteur se adaugă încet un volum egal de reactiv nitric-nitros. Pipeta Pasteur este introdusă cu grijă în LCR pînă la fundul eprubetei și apoi se lasă să curgă reactivul. Dacă reacția este negativă la limita de separare a celor 2 lichide nu apare un inel de precipitare.

**Metoda cantitativă:** LCR se diluează 1/10. Pe această probă se repetă reacția cu acid nitric-nitros, notînd momentul adăugării reactivului. Dacă inelul de precipitare apare exact peste 3 minute, proba conține 0,33 g albumină/1 000 ml LCR. Dacă inelul apare înainte de 3 minute se face o diluție și mai mare: 1/15; 1/20; 1/25...1/100. Se repetă din nou reacția cu acid nitric-nitros și se continuă pînă cînd la ultima diluție nu mai apare inelul caracteristic după 3 minute.

**Calcul:**

$$g \text{ albumină } \text{‰} \text{ ml LCR} = 0,33 \times d$$
$$d = \text{numitorul diluției.}$$



Dacă discul alb foarte fin a apărut în eprubeta cu diluțiile 1/10 și 1/15 și nu apare în cea cu diluția 1/20, proba va conține 0,49 mg albumină ‰ ml ( $0,33 \times 15 = 0,49$  mg ‰ ml).

### 3) Metoda Sicard

*Principiu:* precipitarea la cald a albuminelor cu acid tricloracetic.

Pentru această metodă se folosește rahialbuminometrul Sicard care este un tub de sticlă gradat, până la 4 ml, primii 2 ml prezintă câte 5 subdiviziuni.

*Reactivi:*

acid tricloracetic 33%

*Modul de lucru:* în albuminometru se pipetează:

4 ml LCR

Se încălzește la 80—90°C și se adaugă:

1 ml acid tricloracetic 33%.

Se astupă cu un dop de cauciuc, se agită și se lasă în repaus 24 h.

*Rezultate:*

La LCR normal nivelul precipitatului este până la prima diviziune a albuminometrului:

|            |   |            |                    |
|------------|---|------------|--------------------|
| diviziunea | 1 | corespunde | la 22 mg% albumină |
| "          | 2 | "          | la 40 mg% "        |
| "          | 3 | "          | la 56 mg% "        |
| "          | 4 | "          | la 71 mg% "        |
| "          | 5 | "          | la 85 mg%          |

LCR în care cantitatea de albumină depășește diviziunile albuminometrului se diluează cu NaCl 9‰, la calcul se ține seama de diluție.

Valori normale: 1—2—20 mg albumină % ml LCR. Hiperalbuminorahii se întâlnesc în unele afecțiuni ale sistemului nervos central, cum sînt meningitele acute și cronice, în cazul tumorilor extramedulare, precum și în infecțiile generale și intoxicațiile foarte grave.

În staza rahidiană, albumina crește foarte mult, ajungînd pînă la 800—4 000 mg/100 ml.

Hipoalbuminorahii se întâlnesc în stările congestive ale sistemului nervos.

### 4) Metoda Nonne-Appelt

*Principiu:* globulinele precipită cu o soluție de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

*Reactivi:* soluție saturată  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ..... 85 g

apă ..... 100 ml

Se fierbe și se lasă 24 h la temperatura camerei.

Reacția soluției este slab alcalină; dacă este acidă, se alcalinizează cu o soluție concentrată de amoniac pH = 6,5—6,8.

*Modul de lucru:* într-o eprubetă de hemoliză se pipetează:

Soluție saturată de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ..... 0,5 ml

LCR ..... 0,5 ml

După 2—3', dacă se formează la linia de separare a celor 2 lichide un inel de precipitare, aceasta denotă o creștere a globulinelor. Reacția prezintă diferite grade de intensitate: +, ++, +++.

Reacția este pozitivă în meningitele luetice unde valsearea globulinelor este crescută între 1—4 g‰.

## UREEA

Se dozează cu metoda Kowarsky (capitol sînge), folosind 2,5 ml LCR în locul filtratului tricoloracetic. În mod normal LCR conține 15—20 mg/100 ml.

## PUNEREA ÎN EVIDENȚĂ A TRIPTOFANULUI

### Metoda Hopkins-Cole

*Principiu:* în mediul acid, triptofanul dă o culoare violet în prezența oxalatului de magneziu.

#### *Reactivi:*

1. Soluție de oxalat de magneziu

magnezie pulbere ..... 10 g

soluție saturată acid oxalic .... 250 ml

se ajustează pH (în prezența unei bule de turnesol) cu acid acetic glacial și se completează cu apă distilată la 1 000 ml;

2. — acid sulfuric concentrat

#### *Modul de lucru:*

Într-o eprubetă se pipetează:

Soluție oxalat de magneziu ..... 5 ml

LCR ..... 2 ml

Se agită și se adaugă

acid sulfuric ..... 1 ml

În prezența triptofanului, la limita de separare a celor 2 lichide, apare un inel violet.

Reacția este negativă dacă nu apare inel de culoare violet, poate apărea însă un inel colorat în brun.

*Interpretare:* se folosește pentru diagnosticul diferențial între meningita tuberculoasă și meningita de altă etiologie, reacția triptofanului fiind pozitivă numai în meningita tuberculoasă.

## DETERMINAREA ACETONEI

*Principiu:* acetona dă cu aldehida salicilică, în prezența hidroxidului de potasiu, o culoare roșie portocalie.

*Reactivi:* 1. aldehidă salicilică 10% în alcool 95°

2. hidroxid de potasiu (rotulis)

*Modul de lucru:* într-o eprubetă se pipetează:

LCR ..... 2 ml

aldehidă salicilică soluție ..... 2 picături

KOH ..... 1 pastilă

Se încălzește ușor.

*Rezultate:* în prezența acetonei apare o culoare roșie-portocalie în jurul pastilei de KOH.

Reacția se folosește pentru diagnosticul comei diabetice sau în studiul cazurilor de acidoză.



## DOZAREA GLUCOZEI

Se efectuează prin metoda Hagedorn-Jensen descrisă la capitolul sînge, folosind 0,1 ml LCR centrifugat. Evaluarea rapidă a glicorahiei se poate face și prin determinarea puterii reducătoare a glucozei față de soluția Fehling, identică ca în cazul dozării glucozei în urină, sau față de soluția Haines.

### Metoda Haines

*Principiu:* în prezența glucozei hidroxidul de cupru este redus la oxid de cupru.

#### Reactivi:

##### Reactivul Haines:

într-o eprubetă se pune:

sulfat de cupru ..... 2 g  
apă ..... 5 ml

după dizolvare se adaugă:

glicerină ..... 15 ml  
NaOH 5% ..... 150 ml

*Modul de lucru:* într-o eprubetă se pipetează:

reactiv Haines ..... 1 ml  
se încălzește la fierbere și se adaugă  
LCR ..... 1 ml.

*Rezultate:* culoarea roșie-galbenă corespunde la 60 mg glucoză % ml LCR, glicorahie normală.

Culoarea violet corespunde la 30 mg glucoză % ml LCR, glicorahie scăzută.

Culoarea albastră corespunde la 20 mg glucoză % ml LCR, glicorahie foarte scăzută.

#### Valori normale:

55—70 mg glucoză % ml LCR

Valori crescute sînt întîlnite în deficiențe cerebrale, tumori, encefalite, la diabetici.

Valori scăzute: în meningite acute (meningococ, TBC).

## DOZAREA CLORURILOR

Clorurile în LCR se determină cu aceleași metode descrise la capitolul sînge (metoda Volhard).

### 1. Metoda Volhard

#### Reactivi:

1. — azotat de argint N/50
2. — acid azotic concentrat
3. — alaun feric 5% în apă distilată
4. — sulfocianură de potasiu N/50

**Modul de lucru:** într-un balon se pipetează:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| LCR .....                    | 1 ml   |
| azotat de argint N/50 .....  | 10 ml  |
| acid azotic concentrat ..... | 2,5 ml |
| alaun feric 5% .....         | 2 ml   |

Se titrează cu sulfocianură de potasiu N/50. pînă ce culoarea roșie-portocalie persistă 30 secunde.

**Calcul:**

$$\begin{aligned} 1 \text{ ml NO}_3\text{Ag N/50} &= 1,17 \text{ mg NaCl} \\ \text{mg NaCl \% ml LCR} &= (10 - n) \times 1,17 \times 100 \\ n &= \text{nr. ml sulfocianură N/50 folosiți la titrare} \end{aligned}$$

## 2. Metoda Mohr modificată

**Principiul:** clorurile sînt precipitate direct cu azotat de argint.

**Reactivi:** 1) cromat de potasiu 10%

2) azotat de argint N/50

Titrarea soluției de NO<sub>3</sub>Ag N/50:

10 ml din soluția 2 trebuie să titreze exact 2 ml dintr-o soluție de NaCl 1% folosind ca indicator soluția de cromat de potasiu 10%.

**Modul de lucru:** Într-o eprubetă se pipetează:

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| LCR centrifugat .....       | 2 ml       |
| apă distilată .....         | 10 ml      |
| cromat de potasiu 10% ..... | 3 picături |

se titrează cu soluția de azotat de argint pînă ce culoarea virează spre brun.

**Calcul:**

$$g/1\,000 \text{ ml LCR} = \text{nr. ml NO}_3\text{Ag folosiți la titrare}$$

**Valori normale:** 7,20—7,50 g<sup>o</sup>/100 ml

**Valori crescute:** în nefrite, abcese și tumori cerebrale.

**Valori scăzute:** meningită acută netuberculoasă; clorura de sodiu sub 5 g<sup>o</sup>/100 indică aproape sigur meningita tuberculoasă.

Valoarea de 6,5 g<sup>o</sup>/100 exclude meningitele tuberculoase. Cînd cantitatea de clorură de sodiu este cuprinsă între: 5,5—6,5 g<sup>o</sup>/100, formula leucocitară are mare importanță:

- limfocitoza indică meningita tuberculoasă
- polinucleoza exclude meningita bacilară.

## PROBA REDUCERII PERMANGANATULUI DE POTASIU

**Tehnica P. Ferencz**

**Principiu:** constă în reducerea permanganatului de potasiu de către LCR într-un timp determinat.

**Reactivi:** soluție permanganat de potasiu 1,5<sup>o</sup>/100

**Modul de lucru:** într-o eprubetă se pipetează:

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| LCR .....                    | 1 ml   |
| permanganat de potasiu ..... | 0,1 ml |



Se agită și se lasă în repaus la  $t^{\circ}$  laboratorului notînd timpul de decolorare de la violet la galben.

Valori normale: timpul de decolorare este de 120 secunde.

În meningita acută și toxică la copii reducerea permanganatului este instantanee.

## PERMEABILITATEA LA NITRAȚI

Proba constă în ingerarea cu 3 ore înainte de puncția lombară sau occipitală a unui gram nitrit de sodiu (dizolvat în 100 ml apă) pentru 30 kilograme greutate corporală.

Această probă stabilește alterarea permeabilității meningiene.

*Principiu:* nitrații dau o colorație albastră cu difenilamină.

*Reactivi:*

1)  $H_2SO_4$  concentrat

2) Difenilamină 1% în  $H_2SO_4$  70%  
difenilamină ..... 1 g  
 $H_2SO_4$  70% ..... 100 ml

3) nitrat de sodiu 1 g% soluție etalon. Soluția conține 1 mg nitrat/ml.

Din soluția etalon se prepară o serie de martori cu: 1, 2, 3, 4, 5 și 6 mg nitrat % ml.

*Modul de lucru:* în două eprubete se pipetează:

|                            | Probă      | Martor<br>(3 g nitrat la % ml) |
|----------------------------|------------|--------------------------------|
| $H_2SO_4$ concentrat       | 1 ml       | 1 ml                           |
| difenilamină 1%            | 4 picături | 4 picături                     |
| LCR                        | 3 picături | —                              |
| soluție de nitrat 3 mg% ml | —          | 3 picături                     |

Se amestecă, iar după 5' conținutul probei se compară cu proba etalon sau se compară cu cele care alcătuiesc scara de etaloane. Citirile pot fi efectuate și la aparate fotocolorimetrice.

Valoarea diagnostică a probei se stabilește ținînd seama că LCR conține 1 mg nitrat % ml.

## EXAMENUL MICROSCOPIC

### 1. Examenul citologic:

Se efectuează prin numărătoarea elementelor pe camerele Nageot (sau Fuchs-Rosenthal, Bürker-Türk).

### 2. Examenul morfologic:

Se face pe sedimentul LCR, centrifugat și decantat în felul următor: pe o lamă de microscop se ia cu o pipetă Pasteur și se face un frotiu care se usucă, se fixează cu alcool-eter (în părți egale) și se colorează cu albastru de metil sau Giemsa.

Tabelul XCII

## Variațiile normale și patologice ale compoziției lichidului cefalorahidian

| Aspect, culoare           | Lichid normal           | Meningite netuberculoase                | Meningite tuberculoase | Meningită cronică | Encefalite și mielite | Congesție menin-<br>geală simplă | Sază rahidiană<br>(compresia<br>măduvei) | Impermeabilitate<br>renală (clorure-<br>nit, azotemie) |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                           | Limpede, incolor        | Turbure<br>purulent ușor<br>xantocromie | Limpede, incolor       | Limpede, incolor  | Limpede, incolor      | Limpede incolor                  | Limpede,<br>xantocromie                  | Limpede incolor                                        |
| Albumină                  | 0,18 g <sup>o</sup> /oo | 2—8                                     | 1—3                    | 0,5—1,0           | 0,50—3,0              | 0,10                             | 5,0—40,0                                 | 0,18                                                   |
| Cloruri                   | 7,32 mg%                | 6,4—6,0                                 | 5,0—6,3                | 7,0—7,20          | 7,30                  | 6,8—7,0                          | 5,0—7,30                                 | 7,50—9,00                                              |
| Glucoză                   | 0,59 mg%                | urme                                    | urme                   | 0,35—0,5          | 0,50                  | 0,7—1,0                          | 0,50                                     | 0,70—1,00                                              |
| Uree                      | 0,25 mg%                | 0,20                                    | 0,20                   | 0,20              | 0,20                  | 0,20                             | 0,20                                     | 1,0—6,0                                                |
| Permeabilitate la nitrați | 10—12 mg                | 50—55                                   | 50—85                  | 9—25              | 9—13                  | 15                               | —                                        | variabile                                              |



În sediment se pot găsi: limfocite, granulocite neutrofile, monocite, plasmocite și celule endoteliale normale sau alterate.

### 3. Examenul bacteriologic și virusologic

Conduita examenului bacteriologic constă în:

I. a) *Examen microscopic* pe frotiuri colorate: albastru de metil, Gram sau Ziehl-Neelsen (cînd se suspectează o meningită TBC).

b) *Însămînțări*: pe medii bogate în lichide organice, pe medii de cultură incubate în atmosferă de  $\text{CO}_2$  10% sau pe medii uzuale.

c) *Izolarea și identificarea* germenilor efectuată după schemele indicate la capitolul „Bacteriologie”.

II. *Examenul virusologic* pentru virusul poliomieltic, Echo, Coxsackie, gripal (vezi capitolul de Virusologie).

III. *Examen imunologic* folosit pentru diagnosticul bolilor nervoase de natură luetică.

Reacțiile folosite sînt:

— Reacția de floclurare (citochol, Meinicke)

— Reacția de fixare a complementului (Bordet-Wasserman)

## CAPITOLUL XII

### VARIA

## LICHIDELE PATOLOGICE DE PUNCȚIE

Lichidele de puncție se clasifică în lichide inflamatoare, numite exsudate, în lichide de origine mecanică, numite transsudate și în lichide din chisturi de retenție.

Orice lichid de puncție este examinat: macroscopic, citologic, bacteriologic, serologic și chimic.

### EXAMENUL MACROSCOPIC

Exsudatele sînt lichide seroase ușor opalescente în mod normal și purulente, hemoragice și lactescente în cazuri patologice.

Transsudatele sînt în mod normal lichide transparente, rar în cazuri patologice apar purulente.

### EXAMENUL CITOLOGIC

Se face pe un frotiu din sediment colorat, un timp mai scurt decît la frotiurile de singe, 6—10 minute, cu colorant Giemsa. Examenul trebuie efectuat cît mai repede după puncție, pentru a împiedica formarea cheagului de fibrină, care înglobează cea mai mare parte din celule. În lichidul pleural, granulocitele neutrofile în proporții mari indică trecerea la micropurulență, iar predominanța lor aproape în totalitate semnaleză transformarea purulentă a revărsatului. În pleurezia serofibrinoasă, creșterea procentuală a granulocitelor eozinofile înseamnă mersul spre vindecare. Alteori, ele semnaleză existența unei componente alergice. Limfocitele constituie un indiciu pentru natura tuberculoasă. Plasminocitele au o semnificație mai puțin specifică; sînt semnul unei iritații. Macrofagele se întîlnesc în cantitate mică în revărsatele pleurale tuberculoase. Prezența în număr mare a celulelor endoteliale rezultă dintr-o descumare a lor, mai mult sau mai puțin accentuată, de pe



pleure. Alte celule care mai pot fi semnalate sînt cele atipice sau canceroase, cu mitoze anormale.

În lichidul de ascită, elementele figurate cel mai frecvent întîlnite sînt limfocitele. Ele sînt prezente în proporții mari în peritonitele bacilare. În număr mai mic se întîlnesc și în cirozele ascitogene. Anumite cancere, îndeosebi cel hepatic, favorizează apariția celulelor neoplazice în lichidul de ascită.

În lichidele articulare este important de semnalat îndeosebi prezența granulocitelor neutrofile sau a limfocitelor. Predominanța primelor denotă un proces acut. Limfocitele în proporții mari sau în exclusivitate sugerează un proces cronic, de cele mai multe ori de origine tuberculoasă.

#### EXAMENUL BACTERIOLOGIC

Se face după schema expusă la examenul bacteriologic al secrețiilor purulente.

#### EXAMENUL SEROLOGIC

Se face după indicațiile date la examenele analoge din LCR.

#### EXAMENUL CHIMIC

1. Densitatea lichidelor de puncție se determină cu urodensimetru.

Transsudatele au densitatea de 1 006—1 015, cele din tumori, de 1 018—1 025, iar exsudatele de 1 018—1 022.

2. Proteinele în lichidele de puncție sînt puse în evidență prin reacția Rivalta.

La transsudate, reacția Rivalta este de obicei negativă, iar la exsudate reacția este pozitivă.

##### Reacția Rivalta

*Principiu:* fracțiunile proteice în concentrație de peste 3% sînt precipitate cu soluții diluate de acid acetic.

##### Reactivi:

acid acetic glacial ..... 0,5 ml‰ apă distilată

##### Modul de lucru:

Într-un pahar conic se pun circa 300 ml acid acetic glacial diluat, lăsîndu-se să cadă la suprafață o picătură din lichidul de cercetat.

Dacă se obține o opalescență ca un fum de țigară, reacția este pozitivă (exsudat), dacă nu se produce nici o modificare, reacția este negativă (transsudat).

Reacția Rivalta poate să diferențieze transsudatul (cu 1—3 % proteină în cursul unei staze generale circulatorii ori în afecțiuni renale) de exsudat (peste 3% proteină de natură inflamatorie). Determinările cantitative ale proteinelor, glucidelor, sărurilor din lichidele de puncție se efectuează după tehnicile utilizate la urină sau sînge.

## TESTE DE SARCINĂ

### 1. Test biologic

#### (Reacția Galli-Mainini)

*Principiu:* reacția se bazează pe rolul hipofizei și al hormonilor gonadotropi în spermatogeneză; se execută pe broscoi indiferent de specie. Broasca masculă se diferențiază de femelă prin pernțele de la nivelul degetelor mari ale membrelor anterioare.

*Material:* broscoi care în prealabil au fost verificați pentru absența spermatogenezei și urina de dimineață proaspătă sau conservată 24—48 ore la +8°C provenită de la gravidă. Cantitatea de urină injectată este în raport cu greutatea animalului: 1 ml la 10 g greutate animal;

- lame și lamele de microscop;
- microscop.

*Modul de lucru:* broscoiul se ține imobilizat cu fața ventrală în palma stîngă și se injectează urină subcutanat în regiunea dorsală inferioară în sacul dorsal limfatic (acul fiind vizibil sub piele). La 2—3 ore de la inoculare se catherinează cloaca și se controlează prezența spermatozoizilor între lamă și lamelă. Reacția începe să devină pozitivă la 2 ore și persistă 12—14 ore.

Citirea rezultatelor:

- reacția este slab pozitivă ( $\pm$ ) dacă dispăre după 3 ore;
- “ “ pozitivă (+) dacă persistă după 4 ore;
- “ “ intens pozitivă (++) dacă persistă după 8 ore,
- “ “ foarte intens pozitivă dacă persistă după 24 ore.

Indicațiile diagnosticului biologic de sarcină sînt:

- diagnosticul precoce al sarcinii, reacția devine pozitivă din a 3-a săptămîină după fecundație;
- diagnosticul rapid al unei sarcini extrauterine, în acest caz reacțiile sînt slab pozitive, se indică dozarea cu urină concentrată;
- diagnosticul diferențial al unor amenorei de diferite origini ce evoluează cu tumori abdominale sau uterine;
- urmărirea evoluției sarcinii, reacția este pozitivă în caz de evoluții normale și se negativează la 48—72 ore după naștere;
- diagnosticul unor cazuri de retenție placentară sau a unor tumori de tip corial.



## 2. Test imunologic

**Principiu:** se bazează pe reacția antigen-anticorp dintre hormonul HCG (gonadotrofină corionică umană) prezent în urina femeilor gravide și serul antihormon HCG.

Cantitatea optimă de hormon (HCG) este între 41—109 zile de la ultimul ciclu. După acest interval de timp cantitatea de HCG scade foarte mult rămânând la un nivel minim ce se menține până la naștere.

Sensibilitatea optimă a testului este de 12 zile de la întârzierea ciclului sau 41 de zile de la ultimul ciclu.

### a) Testul Pregnostisec

**Reactivi:**

- urină
- seturi „Pregnostisec“ Organon

Un set conține 25 lame. Pe o lamă se găsește serul anti HCG și hormonul HCG sub formă de 2 picături uscate, una incoloră iar cealaltă colorată. Picătura incoloră conține serul anti, iar picătura colorată conține antigenul adsorbit pe latex.

- pipete
- apă distilată

**Modul de lucru:**

O picătură de urină se adaugă peste serul anti HCG.

O picătură de apă distilată se adaugă peste antigenul adsorbit pe latexul colorat în galben. Cu o baghetă se amestecă fiecare picătură în parte și apoi se amestecă prin înlocuire timp de 2 minute cele două picături și se citesc rezultatele.

**Rezultate:**

- prezența aglutinării — reacție negativă
- absența aglutinării — reacție pozitivă
- un rezultat pozitiv este categoric și nu se mai repetă
- un rezultat negativ la 41 de zile de la ultimul ciclu trebuie repetat după 10—20 zile.

Reacție fals pozitivă este în cazul epiteliomului chorionic și în mola hidatiformă.

### b) Testul de inhibare a hemaglutinării (vezi addendum).

## LAPTELE

Laptele este un lichid opac de culoare albă-albăstruie, cu gust dulce și miros special în funcție de speța animală. Se examinează:

- macroscopic
- microscopic
- chimic

a) Examenul macroscopic constă în aprecierea aspectului, culorii și consistenței.

b) Examenul microscopic:

Laptele se prezintă sub forma unei emulsii formate dintr-o parte lichid (lactoplasmă) și din mici globule de grăsime.

În primele zile după naștere, glanda mamară secretă un lichid gros, gălbui și mai dens decât laptele ( $D = 1,050$ ) — colostru — care conține globule de grăsime, leucocite și o serie întreagă de elemente muriforme, fără nucleu numite corpusculi de colostru.

c) Examenul chimic:

- reacția (pH-ul) este ușor alcalin;
- densitatea: 1 028—1 035 determinată cu lactodensimetrul sau densimetrul obișnuit;
- compoziția chimică a laptelui de femeie și de vacă este redată în tabelul XCIII.

Tabelul XCIII

|                  | Lapte de femeie | Lapte de vacă |
|------------------|-----------------|---------------|
| Apa              | 87,5            | 87,3          |
| Substanțe solide | 12,5            | 13,0          |
| Proteine totale  | 1,0—1,5         | 3,0—4,0       |
| Grăsimi          | 3,0—4,0         | 3,5—5,0       |
| Lactoză          | 7,0—7,5         | 4,5—5,0       |
| Cenușă           | 0,2             | 0,75          |

DOZAREA PROTEINELOR

Cazeina, principala proteină a laptelui în structura căreia intră acizi aminați indispensabili nutriției, se poate doza cantitativ:

Într-un vas Erlenmayer se pipetează:

lapte ..... 5 ml  
alcool 96° ..... 50 ml  
acid acetic conc. .... 2 picături

Se lasă în repaus 2 ore după care amestecul precipitat se filtrează prin două filtre tarate, de aceeași greutate și se spală bine cu un amestec de alcool-eter. Ultima spălare se face numai cu eter. Se usucă filtrele la etuvă până la greutate constantă și se cântăresc.

Calcul:

mg cazeină  $\%$  ml lapte = greutatea precipitatului  $\times 200$ .

Laptele conține și cantități foarte mici de lactalbumină și lactoglobulină.



## DOZAREA LIPIDELOR

**Metoda Adam:** se determină untul din lapte.

**Reactivi:**

— alcool amoniacal:

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| amoniac pur .....           | 30 ml    |
| alcool 90° .....            | 833 ml   |
| apă distilată pînă la ..... | 1 000 ml |

— soluție Adam:

|                        |        |
|------------------------|--------|
| alcool amoniacal ..... | 100 ml |
| eter .....             | 100 ml |

**Modul de lucru:** într-o pilnie de separare se pipetează:

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| lapte bine omogenizat ..... | 10 ml |
| soluție Adam .....          | 22 ml |

Se amestecă bine și se lasă în repaus 1/2 oră.

Pătura inferioară se culege într-un balon de 50 ml.

Se spală de cîteva ori cu apă distilată. Grăsimile astfel spălate se trec într-o capsulă cîntărită, spălînd pîlnia cu 3—4 ml eter care se pun tot în capsulă.

Se evaporă la 100°, după răcire se cîntărește capsula.

**Calcul:**

$g \text{ lipide } \% \text{ ml lapte} = \text{greutatea reziduului} \times 100$

## DOZAREA LACTOZEI

Se poate efectua polarimetric, refractometric sau chimic.

**Metoda chimică Denigès**

**Reactivi:**

- reactiv Patein nitromercuric (vezi preparare la deproteinizarea urinei)
- NaOH 33%
- pulbere de zinc
- soluție Fehling sau reactiv Benedict

**Modul de lucru:** într-un balon cotat de 50 ml în care s-a făcut colectarea laptelui degresat cu soluție Adam se adaugă:

|                             |       |
|-----------------------------|-------|
| reactiv Patein .....        | 4 ml  |
| apă distilată pînă la ..... | 50 ml |

Se amestecă și se filtrează

Filtratului i se adaugă:

|                  |     |
|------------------|-----|
| Zn pulbere ..... | 2 g |
|------------------|-----|

Se agită și se lasă în repaus 1 oră. Din filtrat se iau 25 ml care se neutralizează cu NaOH în prezența hîrtiei indicator și se completează cu apă distilată într-un balon cotat de 50 ml și se filtrează, diluția laptelui în aceste condiții fiind de 1/10.

Dozarea se face cu soluție Fehling sau soluție Benedict titrată în prealabil cu o soluție de lactoză 1%.

Compoziția în vitamine a laptelui (mg la ‰ ml)

|                          | Laptele de femeie | Laptele de vacă |
|--------------------------|-------------------|-----------------|
| Vitamina A               | 0,6               | 0,6             |
| Carotenă                 | 0,25              | 0,33            |
| Vitamina B <sub>1</sub>  | 0,07—0,29         | 0,4             |
| Vitamina B <sub>2</sub>  | 0,15—0,5          | 0,1—0,15        |
| Acid nicotinic           | 1,9               | 0,9             |
| Acid pantotenic          | 2,46              | 3,2             |
| Acid folic               | 0,45              | 0,05            |
| Vitamina B <sub>6</sub>  | 0,18              | 0,67            |
| Vitamina E               | 10—48             | 0,6—1           |
| Vitamina K               | 8                 | 30              |
| Biotină                  | 0,008             | 0,03            |
| Inozitol                 | 33                | 18              |
| Vitamina C               | 40—70             | 20              |
| Vitamina D               | 0,001—0,0015      | 0,002—0,005     |
| Vitamina B <sub>12</sub> | 0,0004            | 0,0016—0,0065   |



## ADDENDUM \*

### CELULELE LIMFOCITARE

Aceste două grupe de celule limfocitare, T și B, sînt diferite din punct de vedere al originii, al structurii morfologice, al teritoriului periferic pe care-l populează și al funcțiilor pe care le îndeplinesc. Limfocitele T sînt responsabile de imunitatea celulară iar limfocitele B asigură imunitatea mediată, umorală.

Limfocitele T sînt celule cu originea în timus sau în alte organe limfopoietice (splină, măduva osoasă) dar dependente de stimulii hormonal timici. Ele participă în reacția de hipersensibilitate întârziată și asigură imunitatea anti-grefă, anti-tumoare, funcții pe care le realizează prin limfokinele pe care le produc după contactul cu antigenele specifice.

Limfocitele B, cu filiația față de celulele-sușă mai puțin lămurită la mamifere, își au originea în măduva osoasă. După contactul cu antigenul vor prolifera și se vor diferenția în plasmocite, ce sintetizează o populație de imunoglobuline cu rol de anticorpi, și în celule înzestrate cu memorie imunologică.

Celulele limfoide (T și B) au pe suprafața lor receptori pentru atașarea antigenelor, reprezentînd în imunologie cheia tuturor proceselor.

Celulele T se caracterizează prin 2 markeri: receptori pentru antigeni și receptori pentru globulele roșii de berbec.

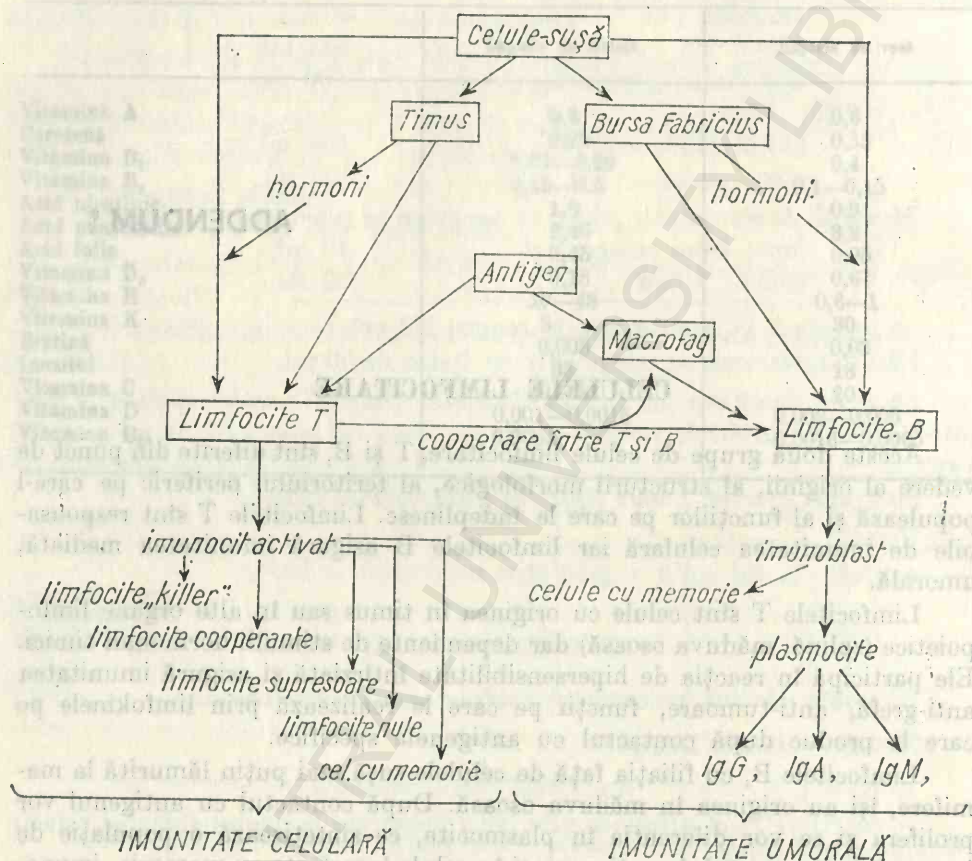
Celulele B se caracterizează prin 3 markeri principali: imunoglobulinele pe suprafață (IgS), receptori pentru fracțiunea C<sub>3</sub> și receptori pentru fragmentul Fc al Ig.

Celulele T sînt primele care iau contact cu antigenul pe care îl atașează pe suprafața lor și îl trec limfocitelor B derivate din măduva osoasă. Acestea

\* Avînd în vedere faptul că lucrarea a fost trimisă la cules acum doi ani, pentru actualizare redăm în „Addendum” o serie de metode introduse recent în practica laboratorului clinic (N.A.).

din urmă au proprietatea de a se transforma în plasmocit-celule formatoare de anticorpi

Figura de mai jos redă reprezentarea schematică a celor două tipuri de răspuns imun: tip celular și tip umoral.



## METODE DE IMUNOLOGIE CELULARĂ APLICATE ÎN LABORATORUL CLINIC

Investigarea celulelor implicate în răspunsul imun celular se poate realiza fie prin teste *in vivo*, fie prin teste *in vitro*.

Cele mai utilizate teste aplicate *in vivo* sînt intradermoreacții cu antigene reprezentate de alimente, germenii, paraziți, fungi, substanțe chimice.

Dintre testele *in vitro* menționăm:

A. Metodele de detectare a celulelor-antigen reactive realizate prin:

- imunofluorescență;
- tehnica rozetelor imune utilizate pentru detectarea celulelor antigen-reactive și prin care se evidențiază atât limfocitele T, cit și limfocitele B;



— tehnica rozetelor neimune utilizată pentru detectarea altor celule în afara celor antigen-reactive și prin care se determină numai procentul limfocitelor T.

B. Metodele de detectare a celulelor formatoare de anticorpi:

— metoda hemolizei locale în gel (metoda Jerne);

— metode de inducție *in vitro* a formării anticorpilor.

C. Metode de transfer adoptiv.

D. Detectarea celulelor T citotoxice.

E. Detectarea celulelor T care participă în hipersensibilitatea întârziată prin:

— transformarea blastică;

— inhibarea migrării macrofagelor.

Aceste metode, în afară de faptul că sînt de puțin timp aplicate în scop de diagnostic, necesită condiții speciale de lucru, sînt minuțios de aplicat, nu sînt standardizate și valorile normale nu au fost stabilite încă.

Se vor prezenta în detaliu numai metodele care pot fi folosite azi în unele laboratoare clinice.

## I. METODA „ROZETELOR E”\* sau METODA „ROZETELOR DE BERBEC”

**Principiul:** limfocitele T conțin receptori pentru eritrocitele de berbec. Puse în contact, limfocitele T cu eritrocitele de oaie formează rozete. Rozeta este imaginea dată de un limfocit de care aderă 3 sau mai multe eritrocite.

**Reactivi și materiale:**

— ser normal de vițel IC;

— soluție Hanks IC 10x concentrată.

Pentru lucru se diluează 1/10, se neutralizează cu cîteva picături dintr-o soluție de bicarbonat de sodiu 5%;

— soluție Alsever pH 6,1:

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| dextroză anhidră..... | 20 g     |
| NaCl.....             | 4,2 g    |
| citrat trisodic ..... | 8 g      |
| acid citric .....     | 0,5 g    |
| apă distilată .....   | 1 000 ml |

— suspensie eritrocite de berbec.

Singele de berbec recoltat pe soluție Alsever (v/v) se spală prin centrifugare de 3 ori cu ser fiziologic; din sediment se face o suspensie 1% în ser de vițel sau soluție Hanks. Eritrocitele de berbec se folosesc proaspete sau ținute pe Alsever cel mult 2—3 săptămîni.

— reactiv Odiston-Ficoll Hipaque:

|                      |         |
|----------------------|---------|
| Odiston 75% .....    | 13,7 ml |
| Ficoll Hipaque ..... | 86,3 ml |

— eprubete sau sticlute cu 100 U heparină pentru recoltarea a 10 ml singe;

— suspensie de limfocite  $4 \times 10^6/\text{ml}$ .

Se recoltează 10 ml singe într-un flacon cu 100 U heparină.

\* E = eritrocit.

Se agită 10 min. și se amestecă v/v cu ser fiziologic.

Într-o cupă de centrifugă se pipetează 3 ml reactiv Odiston-Ficoll peste care se adaugă încet pe perețele vasului 3 ml amestec suspensie de limfocite. Amestecul se lasă 30 min. la 37°C și apoi se centrifughează 15 min. la 2 000 t/minut.

Se obțin 3 straturi:

1 — sedimentul de eritrocite este la fundul eprubetei;

2 — supernatantul în porțiunea superioară a eprubetei;

3 — inel albicios de limfocite la suprafața de separare a acestor 2 straturi.

Se decantează supernatantul prin aspirare, se culege stratul de limfocite și se trece într-un tub care conține 5 ml soluție Hanks (clătinind tubul încet fără barbotare). Se centrifughează 10 min. la 1 000 t/min., se decantează supernatantul iar sedimentul se reia în 2—3 picături de soluție Hanks pentru a se obține o suspensie de  $4 \times 10^6$ /ml.

*Modul de lucru:*

0,2 ml suspensie de limfocite plus 0,2 ml suspensie de eritrocite se incubează la 37°C, 15 min., iar după centrifugare se menține 12 ore la +4°C. Se decantează supernatantul, lăsându-se foarte puțin pentru resuspendarea sedimentului celular efectuat prin mișcări ușoare de agitare. Pe o lamă de microscop se lasă să cadă o picătură din sedimentul resuspendat luat cu o pipetă Pasteur mai largă. Picătura se acoperă cu o lamelă, se apasă încet pentru eliminarea lichidului în exces. Citirea se face imediat la microscop, obiectiv 40, pentru a se stabili procentul de limfocite de care aderă mai mult de 3 eritrocite de herbec.

Se numără rozetele și limfocitele libere (100 elemente):

$$\text{rozete \%} = \frac{n \text{ (numărul de rozete)}}{N \text{ (limfocite totale)}} \times 100$$

Numărul absolut de rozete pe ml este calculat în funcție de numărul de limfocite din singele total.

## II. IMUNOFLUORESCENȚĂ DIRECTĂ

*Principiul:* limfocitele B avind pe suprafața lor receptori pentru imunoglobuline puse în contact cu o soluție de imunoglobuline, în prezența serului antiglobulină umană marcat cu fluoresceină, devin fluorescente.

*Reactivi și materiale:*

— soluție gelatină 3% în ser fiziologic

— tampon fosfat pH 7,2:

clorură de sodiu ..... 8,5

fosfat disodic  $2H_2O$  ..... 1,28 g

fosfat monopotasic ..... 0,39 g

apă distilată ..... 1 000 ml

— ser antiglobulină umană marcat cu fluoresceină IC

— ser vițel inactivat IC

— glicerină tamponată (pentru montarea preparatelor):

glicerină neutră ..... 9 părți

tampon fosfat ..... 1 parte



- alcool metilic
- microscop binocular obișnuit prevăzut cu condensator UV lampă  $\text{HBO}_{200}$ , sursă de lumină ultraviolete
- filtre: filtru caloric
- filtre de excitație și baraj
- lame și lamele de microscop

Suspensia de limfocite  $4 \times 10^6/\text{ml}$  vezi metoda rozetelor.

#### *Modul de lucru:*

1 ml suspensie de leucocite plus 0,1 ml antiser fluorescent diluat conform titrului se menține în baie cu gheață, 20 minute, după care urmează 3 spălări prin centrifugare cu tampon fosfat rece. Sedimentul este reluat într-o picătură de ser de vițel inactivat din care se prepară un frotiu care se fixează cu alcool metilic 10 min și se montează în glicerină tamponată, examinarea făcându-se în lumină ultravioletă cu obiectivul 20. Filtrul de excitație BG12/4 și filtrele de baraj OG1/4,5 + GG9/1 constituie o combinație de filtre care permit o citire clară.

### III. TRANSFORMAREA BLASTICĂ (metoda radioizotopică)

#### *Principiu:*

Transformarea blastică are ca principiu incorporarea timidinei marcate (care poate fi măsurată radiometric) în ADN-ul nou sintetizat.

Sînt descrise numeroase metode efectuate atît cu sînge integral, cit și cu limfocite separate.

#### a) METODA DE TRANSFORMARE BLASTICĂ EFECTUATĂ CU SÎNGE INTEGRAL

##### *Reactivi și materiale:*

- heparină
- sînge recoltat pe heparină
- mediul pentru culturi celulare IC65
- antibiotice: penicilină, streptomycină
- PHA (phitohemaglutinină P Difco), stimul nespecific
- timidină 3H
- acid acetic 3%
- acid tricloracetic 5%
- contor de scintilație
- hidroxid de sodiu N.

##### *Modul de lucru:*

10 ml sînge recoltat pe 100 U heparină se amestecă în proporție de 1/5 cu mediu pentru culturi celulare la care se adaugă penicilină și streptomycină.

Pentru fiecare probă se lucrează 4 tuburi, 3 pentru studiul incorporării de timidină 3H și unul pentru morfologia celulară. Fiecare tub conține 3 ml sînge la care se adaugă mitogen PHA, în doze stabilite în prealabil.

Tuburile sînt incubate la  $37^\circ\text{C}$  într-o atmosferă de  $\text{CO}_2$  timp de 68 ore. Se adaugă în 3 tuburi 1  $\mu\text{Ci}$  timidină și se amestecă bine. După 72 ore se adau-

gă 2—3 volume acid acetic 3% și se lasă 10 min. pentru a obține liza completă a eritrocitelor.

Se centrifughează, se spală sedimentul de două ori cu acid tricloracetic 5%, i se adaugă câteva picături de hidroxid de sodiu N și apoi se determină radioactivitatea la un contor de scintilație.

Din tubul nr. 4, preparat pentru examinarea morfologică, se fac frotiuri care se colorează cu Giemsa.

#### **b) METODA DE TRANSFORMARE BLASTICĂ EFECTUATĂ CU LIMFOCITE SEPARATE**

##### *Reactivi și materiale:*

- mediul pentru culturi celulare IC65
- acid tricloracetic 3%
- acid percloric 5%
- PA
- soluție Hanks 10 × conc (dil 1/10 și neutralizat cu bicarbonat de Na)
- suspensie de limfocite  $4 \times 10^6/\text{ml}$  (vezi metoda rozetei).

##### *Modul de lucru:*

Pentru fiecare probă se lucrează 4 tuburi, 3 pentru studiul incorporării de timidină 3H și unul pentru morfologia celulară. Fiecare tub conține 1 ml de suspensie de limfocite T plus 0,5 ml PHA (doză stabilită) care după ce sînt incubate la 37°C timp de 3 zile se adaugă timidină tritiată 0,5 microcurie. În continuare tuburile sînt incubate încă 2 ore la 37°C. După răcire se centrifughează la 2 000 t/min., timp de 5 min., se spală sedimentul de 2 ori cu soluție Hanks de lucru, care apoi este reluat în 3 ml acid tricloracetic. După centrifugare sedimentul este reluat în 0,5 ml acid percloric 5%. Se încălzește la 70°C timp de 15 min., se centrifughează din nou iar pe supernatant se determină radioactivitatea la un contor de scintilație.

Determinările se fac pe 100 elemente.

Pentru examinarea morfologică se prepară frotiuri din tuburile la care nu s-a adăugat timidină 3H. Ele se colorează cu Giemsa, fiind în prealabil fixate cu alcool.

Limfocitele transformate blastic prezintă următoarele criterii:

- creșterea dimensiunii celulei
- citoplasma devine bazofilă
- nucleul se mărește cu prezență de nucleoli.

Examinarea morfologică este o metodă care nu necesită aparatură specială iar rezultatele sînt multumitoare.

În general, metodele prezintă variații foarte mari, motiv pentru care se recomandă executarea lor pe mai multe tuburi. Totodată răspunsul limfocitar la fitohemaglutinină este variabil de la individ la individ și chiar la aceeași persoană în diferite momente, astfel că numai diferențele foarte mari între determinări pot fi luate în considerație.



#### IV. INHIBAREA MIGRĂRII MACROFAGELOR (MIF)\*

**Principiu:** inhibarea migrării macrofagelor este în funcție de factorul de inhibare produs de limfocitele sensibilizate. Migrarea este oprită într-un mediu în care există antigenul inductor. Macrofagele, deci, acționează ca indicatori nespecifici ai reacției dintre antigen și limfocitele sensibilizate specifice.

**Reactivi:**

- mediul de culturi celulare IC65
- ser de vițel IC
- suspensie de leucocite (vezi metoda rozetei)
- antigene X
- plăci pentru culturi celulare din material plastic
- tuburi capilare  $\varnothing = 1,4$  mm

**Modul de lucru:**

Tuburile capilare sînt încărcate cu suspensie de leucocite care apoi sînt închise la unul din capete cu plastilină atoxică. Capilarele se centrifughează la 1 000 t/minut, timp de 1—3 minute, apoi cu ajutorul unei pile se secționează capilarul la limita dintre sediment și supernatant, oprindu-se numai partea cu sedimentul. Fiecare capilar astfel pregătit este așezat orizontal în camera de plastic cu capătul liber spre centrul acesteia. Fixarea capilarelor în cameră se face cu parafină fixată de plastilina atoxică. După repartizarea tuburilor capilare în camerele respective, cu o pipetă se încarcă înții camerele martor cu mediu pentru culturi celulare care conțin ser de vițel 10% și apoi camerele probă cu diluțiile corespunzătoare de antigen pentru stimulare, diluții efectuate în mediu de culturi celulare IC65.

Camerele sînt apoi acoperite cu lamele așezate într-un exsicator în atmosferă de  $\text{CO}_2$ . Citirea se face după 24 ore la  $37^\circ\text{C}$ , măsurîndu-se aria de migrare în mediu fără antigen (A—martor) și aria de migrare în mediu cu antigen (A—probă), proiectate pe hirtie Whatman.

$$\text{Indicele „MIF”} = \frac{A \text{ probă}}{A \text{ martor}} \times 100$$

#### DOZAREA COMPLEXULUI PRĚGNANDIOL (CPG) (metoda Crepy)

Se execută pe urina recoltată pe conservant în a 21-a zi a ciclului. Prima urină se aruncă, se recoltează urina din cursul zilei, plus urina din a 22-a zi.

**Materiale și reactivi:**

- spectrofotometru
- eprubete gradate
- coloane de extracție
- baloane de 250 ml
- acid sulfuric concentrat  $D = 1,84$
- eter etilic

\* MIF = macrophage migration inhibition factor

- etanol 96°
- etanol absolut încălzit la 75°
- suc de *Helix pomatia*
- soluție tampon pentru pH 5,2
- soluție de hidroxid de sodiu N
- soluție HCl N/10
- bisulfid de sodiu

**Modul de lucru:** constă în următoarele etape: hidroliză, extracție și precipitare.

#### 1. Hidroliza:

- urină ..... 100 ml acidifiată cu  
acid acetic glacial  
pH 5,2
- tampon pH 5,2 ..... 10 ml
- suc *Helix pomatia* ..... 1,5 ml

18 ore la 37°C după care se adaugă

- suc *Helix pomatia* ..... 3 ml
- tampon pH 5,2 ..... 10 ml

1 oră la 55°C

2. Extracția urinii se face pe coloană cu un amestec de alcool-eter (4:1) timp de 1 oră. Se trece urina peste amestecul alcool-eter de 15 ori.

Extractul eteric se spală cu:

- hidroxid de sodiu N ..... 10 ml și apoi cu 5 ml
- HCl N/10 ..... 5 ml
- apă distilată ..... 2 × 5 ml

Se decantează extractul într-un balon de 250 ml și se evaporă conținutul eteric la sec.

#### 3. Precipitarea:

Extractul sec se reia în 5 ml alcool 96° și se trece într-o eprubetă gradată. Se aduce din nou la sec. Reziduul este dizolvat în 0,5 ml alcool absolut. Se agită, se adaugă 3 ml apă distilată încălzită la 75°C, se agită din nou. Se ține la 37°C 18 ore.

Apa distilată se adaugă fracționat cite 1 ml și se agită puternic.

A doua zi se apreciază cantitatea de precipitat format:

- pp abundent ..... +++ 0,25 cc
- pp abundent ..... ++ 0,5 cc
- pp abundent ..... + 1 cc
- pp foarte slab ..... +2 cc

Se filtrează pe hîrtie Whatman nr. 2 și se spală precipitatul cu apă distilată: o dată cu 1 ml și de două ori cu 0,5 ml. După filtrare se elimină apa cu o hîrtie de filtru făcută sul.

Precipitatul este dizolvat în 4 ml alcool de 95° (încălzit la 40°C) de 2 ori cite 2 ml. Se adaugă apoi alcool pînă la 5 ml. Din acești 5 ml extract alcoolic se iau probe duble de 1 ml sau 0,25 ml (în funcție de aprecierea precipitatului), se aduce la sec și se adaugă un virf de linguriță de bisulfid de sodiu și 3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat. Se dezvoltă o colorație galbenă aurie (reacția Talbot). Se lasă o oră la întuneric, apoi se citesc probele la spectrofotometru la  $\lambda = 390, 430$  și  $470$  față de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



Se calculează corecția Allen și se raportează valoarea obținută și valoarea de la 430 la curba de etalonaj:

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 390 | 430 | 470 |
| 122 | 296 | 215 |
| 130 | 292 | 215 |

Volumul din 24 ore = 790 ml; priza de colorimetrie = 0,5 ml.

Allen =  $290 - \frac{215 + 126}{2} = 124$ ; pe curbă 124 — 50 μg. Valoarea de la 430 (294) pe curbă corespunde la 80 μg.

*Calcul:*

Cantitatea de CPG se calculează după una din cele 2 formule, în funcție de valoarea raportului Allen/430; dacă raportul Allen/430 > 0,75, valoarea de CPG se raportează la 430, iar dacă este < 0,75 se raportează la Allen. Exemplul nostru:

$$\text{I. Allen} = 50 \mu\text{g} \frac{5}{0,5} \times \frac{750}{100}$$

$$\text{Allen/430} = 0,6 \text{ deci}$$

$$\text{II. 430} = 80 \mu\text{g} \frac{5}{0,5} \times \frac{750}{100}$$

cantitatea de CPG se calculează după formula I.

- 50 μg reprezintă valoarea lui Allen pe curbă
- 5 = ml alcool în care s-a dizolvat precipitatul
- 0,5 este priza de colorimetrie
- 750 este volumul din 24 ore
- 100 este volumul de urină luat în lucru

$$430 = 80 \frac{5}{0,5} \times \frac{750}{100} = 6\,000 \mu\text{g} \text{ adică } 6 \text{ mg/24 ore}$$

*Valori normale:*

|       |                |
|-------|----------------|
| 430   | 6—10 mg/24 ore |
| Allen | 4—6 mg/24 ore  |

## CARACTERIZAREA IMUNOGLOBULINELOR

IgG are GM = 160 000 și o concentrație în serul normal de 800—1 600 mg% ml ser sau 100—200 UI/ml.

Unele proprietăți biologice ale IgG sînt condiționate de fragmentul Fc și anume: transferul prin placenta și peretele intestinal, capacitatea de a iniția fixarea complementului, fixarea de receptori cutanați în cazul anafilaxiei cutanate pasive.

Fragmentul Fab, care conferă moleculei activitatea de anticorp, asigură suportul a multipli anticorpi: antibacterieni, antivirali, antitoxici, izohemaglutinine și anticorpilor incompleți anti Rh.

IgM are GM = 300 000 și o concentrație în serul normal de 80—160 mg% ml ser sau 100—200 UI/ml și este suportul anticorpilor din prima fază a răspunsului imun.

TgA are GM = 160 000 și o concentrație în serul normal de 100—350 mg% ml ser sau 70—250 UI/ml.

IgA constituie imunoglobulina predominantă a unor secreții, cum ar fi saliva, colostrul și laptele. Concentrația ei este de 28 mg % ml pentru salivă, 150 mg % ml pentru colostru, 70 mg % ml pentru lacrimi, 53 mg % ml pentru bilă, 74 mg % ml pentru lichid intestinal, 26 mg % ml pentru secreția prostatică și 6 mg % ml pentru secreția vaginală.

IgA prezentă în aceste lichide biologice este constituită din 2 molecule de IgA monomer unite între ele printr-un lanț polipeptidic, numit lanț J și avind atașată o porțiune glicopeptidică denumită „componentă secretorie” (IgA-S).

IgA-S manifestă o serie de proprietăți particulare printre care cea mai importantă este rezistența la acțiunea enzimelor. Prezența selectivă a IgA în secrețiile externe este explicată printr-o sinteză locală preferențială și printr-o difuzie favorizată de epiteliul secretor. Deficiența locală selectivă a IgA se manifestă clinic prin afecțiuni cronice pulmonare și intestinale, IgA serică fiind normală cantitativ și calitativ. Aceasta demonstrează locul de sinteză diferit măcar în partea a IgA secretorii.

IgA este suportul unor anticorpi antibacterieni, antivirali și face parte din prima linie de apărare în vederea protecției mucoaselor, asigurând totodată imunitatea locală intestinală a nou-născutului prin intermediul laptelui matern.

## B. PROTEINE PLASMATICE UMANE PATOLOGICE

Aceste proteine sînt puse în evidență prin imunoelectroforeză dar în mod curent sînt evidențiate prin metoda Ouchterlony.

Ca proteine umane patologice sînt descrise:

*Proteina „C” reactivă* care este o glicoproteină cu greutate moleculară mică (129 000), sintetizată în special de ficat. Are constanta de sedimentare de 7,5 S și este relativ termostabilă.

Specifică oricărui proces inflamator, dar nespecifică unei anumite afecțiuni, proteina „C” reactivă apare la bolnavii cu leziuni inflamatorii sau necroze tisulare la 12—24 ore de la debutul procesului patologic și atinge valori de pînă la 2% din totalul proteinelor serice.

Evidențierea acesteia este de mare importanță mai ales în cazurile în care valorile VSH sînt neconcludente diagnosticului presupus. Dispariția proteinei „C” reactive sau scăderea concentrației ei se petrece înainte ca VSH să se normalizeze, absența ei excluzînd posibilitatea unei afecțiuni reumatice active sau a altei inflamații, chiar dacă VSH este normal.

Decelarea ei are o mare importanță pentru diagnostic, pentru terapie și pentru profilaxia afecțiunilor inflamatorii.

Se întîlnește frecvent la bolnavii cu infecții bacteriene, pneumonii, febre reumatice, afecțiuni reumatice diverse, colagenoze, infarct miocardic, stări postoperatorii, afecțiuni maligne, tuberculoză activă, mielom multiplu, lupus eritematos diseminat etc.

Se determină în mod curent prin metoda dublei difuzii sau a precipitării în tub capilar. Proteina „C” reactivă se poate determina și cantitativ prin metoda Mancini.



*Proteinele Bence-Jones* sînt proteine cu greutatea moleculară mică (22 000—45 000, rareori 90 000) reprezentînd lanțuri ușoare ale imunoglobulinelor (*kapa* sau *lambda*).

Apar în cantitate mare în urina bolnavilor cu mielom Bence-Jones și uneori în urina bolnavilor cu alte paraproteinemii sau afecțiuni maligne (leucemii, osteosarcoame).

Decelarea proteinelor Bence-Jones se efectuează prin dubla difuzie. Urmărirea apariției liniilor de precipitare se face de regulă după 4 ore. Se poate susține diagnosticul imunochimic al proteinuriei Bence-Jones numai în cazul în care apare o singură linie de precipitare fie față de antiserul de tip *kapa*, fie față de antiserul de tip *lambda*.

În cazul mieloamelor sau al macroglobulinemiei Waldenström, însoțite de proteinurie Bence-Jones, poziția electroforetică a benzii urinare este în general în aceeași zonă cu cea a componentei monoclonale serie.

Alfa<sub>1</sub>fetoproteina (AFP) are o greutate moleculară în jur de 64 000 are o mobilitate electroforetică între albumină și alfa<sub>2</sub>-globuline.

Alfa<sub>1</sub>fetoproteina se găsește într-o concentrație mare în primele perioade ale vieții embrionare, nivelul maxim înregistrîndu-se în jurul lunii a V-a de viață intrauterină, după care concentrația ei scade.

Alfa<sub>1</sub>fetoproteina nu se decelează la adultul normal prin metode imunochimice curențe, apărînd în cazuri de neoplazii (carcinom hepatocelular primar, teratoame testiculare) și ocazional în procese mari de regenerare post-hepatică severă.

Evidențierea curentă se face prin metoda dublei difuzii în gel; contra-immunoelectroforeza, crește procentajul depistării carcinomului hepatocelular primar pînă la 90%.

Pentru determinarea cantitativă a alfa<sub>1</sub>fetoproteinei se poate folosi și metoda Mancini.

Creșterea AFP în lichidul amniotic la femeile gravide este un indicator al defectelor de tub neural.

Deși crescută, concentrația AFP în aceste cazuri este sub limita determinată prin IDRS și sînt necesare determinări prin hemaglutinare sau cu anticorpi marcați cu izotopi (RIA) sau enzime (ELISA).

*Hemoglobina fetală* (HbF) sau hemoglobina F este prezentă în eritrocitele bolnavilor cu talasemie fiind singura afecțiune ce prezintă o hipocromie manifestă, o lipsă de utilizare a fierului pentru sinteza hemoglobinei și o hipersideremie. HbF se deosebește de hemoglobina normală în special prin alcalino-rezistență.

Evidențierea HbF se face prin metoda dublei difuzii iar determinarea cantitativă dă posibilitatea unei depistări precoce a talasemiilor și a urmării terapiei aplicate.

## PRODUȘII DE DEGRADARE AI FIBRINOGENULUI

Apar în: ciroze hepatice, stări de șoc, hemoragii severe, afecțiuni renale, nașteri dificile, intervenții chirurgicale mari (histerectomii, prostatectomii), arsuri grave, intoxicații cu barbiturice sau metanol, stres etc.

Pentru decelarea acestor produși în ser este important ca recoltarea singelui să fie făcută în prezența unui inhibitor al plasminei. Plasmina scindează

nu numai fibrina în metafibrină și fibrinolizoptide dar poate descompune și fibrinogenul în produși de degradare.

**Crioglobulinele** sînt proteine care la temperaturi sub 37°C se gelifică. Ele pot fi de tip IgG sau IgM și se clasifică în crioglobuline esențiale (Waldenström, mielom, carcinom) și secundare (infecții cronice, ciroze hepatice etc.). Crioglobulinele sînt puse în evidență prin tehnica descrisă la proteine.

**Paraproteinele** sînt proteine care apar în gamapatiile monoclonale: mielom multiplu (paraproteina IgG sau IgA) și macroglobulinemia Waldenström (paraproteina IgM).

Pot apărea și în alte hemoblastoze (leucoză cronică limfatică, boala Hodgkin), în carcinoame sau în infecții cronice (tuberculoză) etc.

Pentru determinarea lor se folosesc metodele imunochimice.

Gamapatiile pot fi secundare și primare.

Variațiile patologice ale claselor de Ig sînt prezentate în tabelul LXXXVI.

\*

Producții de degradare ai fibrinogenului prezenți în serurile de bolnavi se pun în evidență prin metodele:

a) Metoda de precipitare în tub (Mac Carty).

b) Metoda de precipitare pe lamă (Ferreira)

Metodele sînt descrise la capitolul IV (Metode imunochimice).

c) Metoda de hemaglutinoinhibare din care face parte testul de mai jos:

#### TESTUL PENTRU DETERMINAREA CANTITATIVĂ A FACTORILOR DE DEGRADARE AI FIBRINOGENULUI (metoda Merskey modificată)

**Reactivi:**

**Soluții stoc:**

I.a.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  ..... 53 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  distilată ..... 1 000 ml

b.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ..... 20 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  distilată ..... 1 000 ml

II. citrat trisodic ..... 37,71 g  
 $\text{H}_2\text{O}$  distilată ..... 1 000 ml

1. Tampon fosfat: 0,15 M, pH 7,2.

4 părți soluție (a)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

1 parte soluție (b)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

950 ml soluție izotonică ( $\text{NaCl}$  9‰).

2. Tampon fosfat citrat: 0,15 M, pH 6,4

30 ml soluție  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

65 ml soluție  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

100 ml soluție citrat (II)

3. Soluție glutaraldehidă 2,5%

glutaraldehidă 25% ..... 1 ml

apă distilată ..... 9 ml



4. Hematii proaspete (oaie, om) recoltate pe anticoagulant (soluție Alsever) v/v sau obținute prin defibrinare sint spălate de 3 ori prin centrifugare cu tampon fosfat 0,15 M, pH = 7,2. Din sedimentul hematiilor spălate se face o suspensie de 5% în tampon fosfat (95 ml tampon + 5 ml hematii spălate). Hematiile spălate pot fi păstrate câteva zile la +4°C.

5. Soluție (anticoagulantă) Alsever, pH 6,1

|                        |          |
|------------------------|----------|
| dextroză anhidră ..... | 20 g     |
| clorură de sodiu ..... | 4,2 g    |
| citrat trisodic .....  | 8 g      |
| acid citric.....       | 0,50 g   |
| apă distilată .....    | 1 000 ml |

Sterilizare prin filtru Seitz

6. Hematii stabilizate:

- 10 vol. sediment de hematii proaspete
- 125 ml tampon fosfat
- 25 ml soluție glutaraldehidă 2,5%

Amestecul se agită continuu pe agitator la temperatura laboratorului 2 ore, iar pentru îndepărtarea glutaraldehidei rămase libere, amestecul se spală prin centrifugare de 5 ori cu tampon fosfat. Sedimentul se suspendă în același tampon în concentrație finală de 10%; hematiile astfel prelucrate pot fi menținute în prezența de azidă de sodiu 1<sup>0</sup>/<sub>00</sub> timp de 6 luni.

7. Plasmă umană normală 1/250 în tampon citrat, pH = 6,4.

8. Sensibilizarea hematiilor: la 5 ml suspensie hematii stabilizate în glutaraldehidă se adaugă 5 ml plasmă diluată 1/250. Amestecul este agitat și lăsat 1 oră la +37°C după care este centrifugat 10 min. la 2 000 t/min. Sedimentul obținut se spală o singură dată cu tampon citrat și apoi se reia în același tampon, concentrația finală a hematiilor fiind de 2,5%.

Hematiile astfel prelucrate pot fi menținute în prezența de azidă de sodiu 6 luni.

9. Ser antifibrinogen uman diluat 1/2 000 în tampon citrat, pH = 6,4.

10. Ser uman normal.

11. Seruri de cercetat.

*Materiale:*

1. tuburi sau plăci cu godeuri.

2. pipete gradate de 1 ml.

*Metoda:*

În 10 eprubete se pipetează câte 1 ml tampon citrat pH = 6,4. În prima eprubetă se adaugă 1 ml ser de cercetat, se agită și se trece în tubul 2. Operațiile se repetă până la ultimul tub, obținându-se o serie de diluții succesive de la 1/2 — 1/2 048.

Din aceste diluții se iau:

— 0,1 ml și se trec în 10 godeuri ale unor plăci de aglutinare;

— în fiecare godeu se adaugă 0,1 ml ser antifibrinogen diluție 1/2 000.

Se lasă placa 10 minute la temperatura laboratorului, după care se adaugă 0,1 ml hematii sensibilizate cu plasmă normală 1/250. După agitare plăcile sint lăsate 1 oră la temperatura laboratorului făcându-se o primă citire. Se lasă în continuare fără a se mișca până a 2-a zi după care se face citirea finală.

Ca martor se fac o serie de diluții din ser normal uman și plasmă care se tratează identic ca diluțiile serurilor de cercetat.

Fibrinogenul său produșii de degradare din probele de cercetat neutralizează anticorpul serului imun în care caz hematiile sensibilizate cu fibrinogen nu sînt aglutinate. Anticorpul antifibrinogen neîntrați în reacție datorită lipsei fibrinogenului sau a produșilor de degradare duc la aglutinarea hematiilor sensibilizate.

#### *Citirea rezultatelor:*

Hematiile care nu sînt aglutinate se depun pe fundul tubului sau al godeului sub forma unui disc sau a unei coroane cu marginile foarte netede.

Hematiile aglutinate apar pe fundul tubului sau godeului ca o calotă peliculară ușor granulată, uneori cu chenar neregulat.

Titrul este dat de ultima diluție a probei care mai prezintă o ușoară inhibare a hemaglutinării.

- reacție pozitivă = lipsă de aglutinare
- reacție negativă = aglutinare prezentă.

#### *Calcul:*

$$g \text{ fibrinogen/ml} = 3500 \frac{(A - B)}{C}$$

A = reciproca titrului probei de analizat

B = reciproca titrului probei de ser normal

C = reciproca titrului probei de plasmă normală.

3 500 g fibrinogen la 1 ml plasmă normală.

### TESTUL CRIOGLOBULINELOR

#### *Crioglobulinele*

*Principiu:* crioglobulinele la temperaturi sub 37°C trec în stare de gel, cu redizolvare la cald.

#### *Modul de lucru:*

Singele după coagulare la 37°C se centrifughează în cuvă încălzită. Se separă serul și se menține la 4°C pînă a doua zi. Crioglobulinele precipită sub forma unui depozit albicios. Dacă proba se pune într-o baie de 37°C, depozitul dispare, crioglobulinele trec din nou în soluție.

Crioglobulinele separate prin centrifugare și spălare cu ser fiziologic la rece pot fi cercetate prin metode imunochimice pentru stabilirea tipului de IgG sau IgM.

### TESTUL SIA

Testul SIA (serum in aqua) decelează prezența unei macroglobuline care precipită într-un mediu lipsit de electroliți.

#### *Modul de lucru:*

Dintr-o pipetă se lasă să cadă 1—2 picături de ser într-un cilindru cu apă distilată. Dacă nu se formează precipitat în timpul căderii picăturii de ser în apă, testul este negativ. Dacă se formează precipitat, testul este pozitiv. Rezultatele sînt date în funcție de intensitatea precipitatului: +, ++, +++, ++++.



## b) DOZAREA AZOTULUI AMINIC CU NINHIDRINĂ

**Principiul:** acizii  $\alpha$ -aminați în prezența ninhidrinei dau o colorație albastră-violetă a cărei intensitate este direct proporțională cu concentrația lor.

**Reactivi:**

ninhidrină 2% în alcool de 96°;

ninhidrină..... 2 g bol

alcool 96° ..... 100 ml

— a) etalon stoc glicocol:

glicocol ..... 267 mg

benzoat Na ..... 1 g

HCl 0,1 N ..... 450 ml

— b) etalon stoc acid glutamic:

acid glutamic ..... 525 mg

benzoat de Na ..... 1 g

HCl 0,1 N ..... 450 ml

— c) soluție etalon de lucru:

Cele două soluții etalon a și b se amestecă V/V, se neutralizează cu NaOHN și se diluează 1/20 în alcool de 96°. Soluția etalon conține 5 mg azot aminic/ml.

**Modul de lucru:** 1 ml urină din 24 ore se diluează 1/5 cu apă distilată. Se defecă prin tratare cu alcool 96° în proporție de 1 ml urină + 10 ml alcool 96°. Se agită, se centrifughează, luându-se supernatantul.

În 3 eprubete se pipetează:

|                         | Probă  | Martor | Etalon |
|-------------------------|--------|--------|--------|
| Supernatant             | 1,5 ml | —      | —      |
| Soluție etalon de lucru | —      | —      | 1 ml   |
| Alcool 96°              | —      | 1,5 ml | 0,5 ml |
| Soluție ninhidrină      | 1,5 ml | 1,5 ml | 1,5 ml |

Se agită și se lasă la 70°C 1 minut și apoi se citește imediat extincția probei de cercetat și a etalonului față de martor la  $\lambda = 530 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm<sup>3</sup>.

**Calcul:**

$$\text{mg azot } \text{‰} = \frac{E_P}{E_E} \times 5 \times 84$$

**Valori normale:**

copii: 50—250 mg NH<sub>2</sub> ‰ ml urină

adult: 500 mg NH<sub>2</sub> ‰ ml urină.

## b) METODA COLORIMETRICĂ

**Principiul:** azotul organic transformat în săruri de amoniu prin metoda Kjeldahl dă cu reactivul Nessler o culoare galben-brun-roșiatică.

**Reactivi:**

1. acid sulfuric concentrat

2. soluție de hidroxid de sodiu 20%

3. apă oxigenată 40%

4. reactiv Nessler:

— soluția A:

— biiodură de mercur ..... 10 g

— iodură de potasiu ..... 5 g

— apă distilată ..... 20 ml

— soluția B:

— biiodură de sodiu ..... 20 g

— apă distilată ..... 80 ml

După solubilizare se amestecă soluția A cu soluția B lăsându-se reactivul să stea 2—3 zile pentru a se depune substanțele insolubile. Se decantează supernatantul în sticlă brună, condiție în care poate fi conservat timp îndelungat.

*Modul de lucru:*

Mineralizarea se face în balon Kjeldahl:

— ser ..... 1—2 ml

— acid sulfuric concentrat .. 0,5 ml

— perhidrol ..... 0,5 ml

— perle de sticlă ..... 4—5 bucăți

Balonul se așază pe o sită metalică deasupra unei flăcări mici de bec Bunsen, se ține pînă iese fum de acid sulfuric. Încălzirea se face mai departe încă 2 minute. După răcirea balonului sub curent de apă substanța mineralizată se solubilizează în 5 ml apă + 2,5 ml hidroxid de sodiu, se transvazează soluția din balonul Kjeldahl într-un balon cotelat de 50 ml, se spală apoi balonul Kjeldahl de 3—4 ori, iar apele de spălare se trec în balonul cotelat pînă se aduce la semn.

Din acești 50 ml se iau 5 ml la care se adaugă reactiv Nessler conform tabelului:

|                     | <i>Probă</i> | <i>Martor</i> |
|---------------------|--------------|---------------|
| soluția de cercetat | 5 ml         | —             |
| reactiv Nessler     | 0,25 ml      | 0,25 ml       |
| apă distilată       | —            | 5 ml          |

Se agită bine și se fotometrează imediat sau cel mult după 3—5 min de la adăugarea reactivului Nessler.

Citirea se face la  $\lambda = 430 \text{ m}\mu$ , cuva de  $1 \text{ cm}^3$ .

*Atenție:*

În cazul că nu este nevoie de mineralizare se lucrează cu soluție de cercetat ca atare. Într-un balon cotelat de 50 ml se pipetează 1—2 ml ser și apoi se aduce la semn cu apă distilată.



Din acești 50 ml se iau 5 ml și se lucrează identic ca în cazul probelor mineralizate.

Pentru control se folosește soluția etalon care conține 0,05 mg N/ml, care se obține dizolvind 23,5 mg sulfat de amoniu în 100 ml apă distilată.

### 3 b) METODA CU UREAZĂ (reacția Berthelot)

**Principiul:** este același ca la metoda 2 cu deosebire că amoniaculeliberat în prezența fenolului și a hipocloritului de sodiu dă o culoare albastră (reacția Berthelot).

#### Reactivi:

— tampon fosfat M/15, pH 7

— soluție urează:

— urează ..... 100 mg

— apă distilată ..... 49 ml

— tampon fosfat M/15, pH 7 1 ml

Soluția se prepară în momentul întrebuințării, se filtrează și poate fi conservată 2–3 zile la +4°C.

— reactiv fenolic:

— fenol cristalizat ..... 5 g

— nitroprusiat de sodiu ... 0,025 g

— apă distilată ..... 100 ml

— reactiv hipoclorit:

— hidroxid de sodiu ..... 2,5 g

— hipoclorit de sodiu ..... 0,22 g

— apă distilată ..... 100 ml

Soluția se conservă la întuneric +4°C, timp de 30 zile.

— soluție standard de uree:

— uree ..... 30 mg

— apă distilată ..... 100 ml

— soluție clorură de sodiu.... 9 g %

#### Modul de lucru:

Serul se diluează 1/10 iar urina 1/1 000.

În 3 eprubete se pipetează:

|                         | Probă  | Martor | Standard |
|-------------------------|--------|--------|----------|
| Soluție urează          | 1 ml   | 1 ml   | 1 ml     |
| Ser sau urină (diluata) | 0,2 ml | —      | —        |
| Standard uree           | —      | —      | 0,2 ml   |
| Apă distilată           | —      | 0,2 ml | —        |

Se menține sistemul 15 min la 37°C, pe baie de apă, apoi se răcește la curent de apă.

|                    |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|
| Reactiv fenolic    | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Reactiv hipoclorit | 1 ml | 1 ml | 1 ml |

Se poate lucra și cu serul nediluat folosind cantitatea de 0,05 ml.

Se menține sistemul la întuneric 30 min.

Se completează până la 20 ml cu apă distilată și apoi citirea rezultatelor se face la  $\lambda = 610 \text{ m}\mu$ , cuva de 1 cm.

*Calcul:*

$$\text{g uree } \%_{00} \text{ ml ser} = \frac{E_p}{E_S} \times 0,3$$

$$\text{g uree } \%_{00} \text{ ml urină} = \frac{E_p}{E_S} \times 30$$

Din soluția etalon de uree se fac 3 diluții cu concentrații cunoscute folosite pentru construirea curbei și calcularea „factorului”.

#### 4.b. METODA CU HIPOBROMIT DE SODIU (metoda modificată)

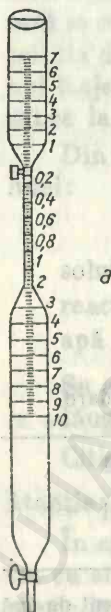
*Principiul* și reactivii sînt aceiași ca la metoda 4 a.

Aparatul este simplificat compunîndu-se numai dintr-un singur tub și anume din tubul gradat (a) care este efilat la partea terminală conform modelului alăturat.

*Modul de lucru:*

Defecarea serului se face în aceleași condiții ca la metoda precedentă (4 a). Urometrul se umple aspirînd reactivul 1 pînă ce trece peste robinetul care se închide imediat după umplerea tubului a. Se îndepărtează lichidul din tubul gradat de deasupra robinetului cu ajutorul unei pipete, se spală acest tub cu puțină apă, care se îndepărtează tot cu pipeta și se usucă cu hirtie de filtru. Se toarnă apoi filtratul tricloracetic, se notează nivelul lichidului, se deschide încet robinetul și se lasă să curgă exact 2,5 ml filtrat tricloracetic în porțiunea inferioară a tubului, închizîndu-se imediat robinetul. Se îndepărtează cu pipeta restul de filtrat, se spală cu apă distilată, se usucă cu hirtie de filtru, pregătîndu-se pentru turnarea soluției de hipobromit de sodiu. Se deschide robinetul, se lasă să curgă 5—6 ml soluție de hipobromit de sodiu reactiv 1, iar  $N_2$  care se dezvoltă împinge „reactivul 1”, care se culege într-un vas așezat sub urometru. Manipulările următoare și calculul sînt aceleași ca la prima metodă.

Manipulările reduse pentru efectuarea reacției și spălarea aparatului Kowarski modificat, care se face direct la robinetul de apă, simplifică mult metoda de dozare a ureei, rezultatele fiind identice.





## 5. METODA CU DIMETILGLIOXIMĂ

**Principiu:** ureea condensează cu dimetilglioxima în mediu acid, dînd un compus colorat.

### Reactivi:

— acid tricloracetic soluție 10%

— dimetilglioximă soluție 1%:

dimetilglioximă ..... 1 g

alcool 80° ..... 100 ml

— reactiv oxidant

antipirină ..... 0,4 g

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_2$  ..... 0,2 g

apă distilată ..... 30 ml

După dizolvare se adaugă:

$\text{H}_2\text{SO}_4$  (D = 1,84) ..... 30 ml

Se lasă să se răcească la temperatura laboratorului și apoi se completează cu apă distilată pînă la 100 ml. Reactivul se păstrează în sticlă brună, la +4°C, o lună.

— standard uree:

uree ..... 50 mg

apă distilată ..... 100 ml

Soluția standard se păstrează la +4°C, sub toluol.

**Modul de lucru:** în eprubete de centrifugă se pipetează:

|                     | Probă  | Standard | Martor |
|---------------------|--------|----------|--------|
| apă distilată       | 1,4 ml | 1,4 ml   | 1,5 ml |
| ser (plasmă, singe) | 0,1 ml | —        | —      |
| acid tricloracetic  | 0,5 ml | 0,5 ml   | 0,5 ml |
| standard uree       | —      | 0,1 ml   | —      |

Se amestecă, iar probele se centrifughează.

|                                            | Probă  | Standard | Martor |
|--------------------------------------------|--------|----------|--------|
| supernatant sau diluție (standard, martor) | 0,5 ml | 0,5 ml   | 0,5 ml |
| dimetilglioximă                            | 0,1 ml | 0,1 ml   | 0,1 ml |
| reactiv oxidant                            | 4 ml   | 4 ml     | 4 ml   |

Se amestecă, se fierbe 30 min pe baie de apă, apoi se răcește sub jet de apă rece. Citirea la  $\lambda = 460 \text{ m}\mu$ , în cuva de 1 cm, față de martor.

**Calcul:**  $\text{EP/ES} \times 50 = \text{mg uree/100 ml de ser (plasmă, singe)}$ .

**Valori normale:** 20 — 50 mg/100 ml ser.

## CLEARANCE-UL GLOMERULAR CU INULINĂ

Efectuarea acestui *clearance* din punct de vedere tehnic este foarte grea, de aceea în clinici se utilizează — pentru orientare — metoda Hamm, în care inulina eliminată se determină numai în urină.

**Tehnica recoltării:** la ora 7 dimineața se golește vezica, se aruncă urina. Bolnavul bea 250 ml ceai slab, neîndulcit. La ora 7 și 5 minute i se face o injecție intravenoasă cu 5 g inulină, dizolvată în 50 ml ser fiziologic. La ora 9 și 5 minute se golește complet vezica și se măsoară exact cantitatea de urină. În urina recoltată se determină cantitatea de inulină.

## B. CLEARANCE-URI HEPATICE

În cazul alterării parenchimului hepatic funcția excretorie a ficatului este diminuată, durata eliminării prelungindu-se proporțional cu gradul de alterare a celulelor hepatice. Cea mai folosită probă în acest scop este:

Proba cu tetrabrom-sulfonftaleină (BSP)

**Reactivi:**

— fiole BSP soluție sterilă 5%

— NaOH soluție 10%

Se cântărește bolnavul și pentru fiecare 10 kg greutate se injectează 1 ml BSP 5%.

Se recoltează proba I, 5 ml sînge și se injectează BSP pe același ac.

După 3 min se recoltează proba a II-a, 5 ml sînge.

După 45 min se recoltează proba a III-a, 5 ml sînge.

**Modul de lucru:**

Se centrifughează separat cele 3 probe de sînge și se pipetează în 3 eprubete:

|               | Eprubeta 1 | Eprubeta 2 | Eprubeta 3 |
|---------------|------------|------------|------------|
| Ser proba I   | 1 ml       | —          | —          |
| Ser proba II  | —          | 1 ml       | —          |
| Ser proba III | —          | —          | 1 ml       |
| NaOH 10%      | 0,5 ml     | 0,5 ml     | 0,5 ml     |

Se amestecă și se fotometrează imediat în cuva de 1 ml,  $\lambda = 578 \text{ m}\mu$ , proba III, apoi proba II, față de proba I.

**Calcul:**

$$\frac{E \text{ III}}{E \text{ II}} \times 100 = \text{ reacție BPS \% după 45 min.}$$

**Valori normale:** pînă la 5% retenție de BPS după 45 min.

**Interpretare:**

0—15% = zona normală



5—25% = alterare moderată a parenchimului hepatic  
 25—75% = alterare gravă a parenchimului hepatic  
 peste 75% = alterare foarte gravă a parenchimului hepatic.

## b) TESTUL DE INHIBARE A HEMAGLUTINĂRII

### Principiu:

Gonadotrofina corionică (HCG) din urina de gravidă inhibă aglutinarea hematiilor încărcate cu hormon de către antigonadotrofina corionică (ser anti HCG).

Urină HCG + hematii HCG + ser anti HCG = test pozitiv.

Serul anti HCG este neutralizat de hormonul prezent în urina de gravidă și aglutinarea hematiilor sensibilizate este inhibată.

Urină — HCG + hematii HCG + ser anti HCG = test negativ.

Urina nu conține HCG și serul anti HCG aglutinează hematiile sensibilizate.

### Reactivi:

— urină

— trusa pentru diagnosticul imunologic al sarcinii, Institutul Cantacuzino; produsul oferă materiale și reactivi necesari executării a 60 teste imunologice.

### Modul de lucru:

Reacția de inhibare a hemaglutinării se efectuează astfel: pe placa cu godeuri se notează pentru fiecare probă de urină (centrifugată pentru a nu conține celule și depozite de săruri) câte un godeu în care se pipetează reactivii (reluți în solvent) în ordinea descrisă în tabelul de mai jos.

Martorul pozitiv (hemaglutinoinhibare) și martorul negativ (aglutinare) se practică conform aceluiași tabel:

| Reactivi                | Probă urină<br>(picături) | Martor urină<br>(picături)* | Martor pozitiv<br>(picături) | Martor negativ<br>(picături) |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1. Solvent              | —                         | 1                           | 2                            | 1                            |
| 2. Urină                | 1                         | 1                           | —                            | —                            |
| 3. Ser anti HCG         | 1                         | —                           | —                            | 1                            |
| 4. Suspensie de hematii | 1                         | 1                           | 1                            | 1                            |

\* Se recomandă a se efectua numai în cazul unei discordanțe între diagnosticul clinic prezumtiv și rezultatul de laborator.

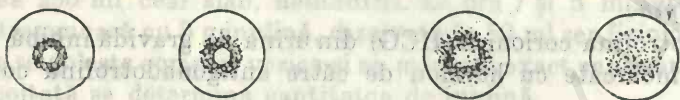
După adăugarea tuturor reactivilor, conținutul godeurilor se omogenizează perfect cu ajutorul baghetei de sticlă și placa se lasă în repaus 2—3 ore la temperatura camerei, la depărtare de surse de căldură și vibrații.

Citirea rezultatelor se face prin transparența capacului fără a mișca placa din loc.

Interpretarea rezultatelor se face conform schemei de mai jos:

*Rezultat pozitiv*

*Rezultat negativ*



*Aspectul depunerii hematiilor în probele de urină pozitive și negative*

#### Recomandări:

- Probele de urină trebuie să fie centrifugate 10 min la 3 000 t/min.
- Se poate lucra și cu urina conservată 3—4 zile la 4°C, după o prealabilă centrifugare înainte de executarea testului.
- Se poate folosi aceeași pipetă pentru mai multe probe de urină cu condiția ca aceasta să fie spălată cu ser fiziologic după pipetarea fiecărei probe.
- După reluarea în solvent, serul anti HCG poate fi păstrat la +4°C timp de câteva zile.
- Suspensia de hematii încărcate cu HCG trebuie utilizată în aceeași zi.

În prezent se lucrează la optimizarea trusei în scopul realizării unui reactiv liofilizat, care să conțină serul antigenadotrofină corionică și hematiile încărcate cu HCG în aceeași fiolă.

★

Diagnosticul de laborator al sarcinii poate fi realizat prin diferite teste efectuate *in vivo* sau *in vitro*.

Testul *in vivo* utilizează diferite specii de animale, gradul de sensibilitate precum și timpul de obținere al rezultatelor variind de la o specie la alta.

| Specia           | Sensibilitate  | Timp    |
|------------------|----------------|---------|
| Șoarece(femală)  | 2 500 UI       | 120 ore |
| Broscoi          | 1 500—2 500 UI | 2 ore   |
| Iepure (femală)  | 500 UI         | 48 ore  |
| Șobolan (femală) | 500 UI         | 20 ore  |

Testele *in vitro* pot fi clasificate în:

- reacții de precipitare (în mediu solid sau lichid), metode cu un grad de sensibilitate relativ scăzut și care nu se utilizează în practica laboratorului clinic;



— reacții de aglutinoinhibare care utilizează ca suport particulele de latex; sensibilitatea este comparabilă cu cea a testelor biologice, oferind avantajul unui timp foarte scurt de obținere a rezultatelor, 2 minute;

— reacții de hemaglutinoinhibare — suportul utilizat îl constituie hematiile provenite de la diferite specii animale; aceste teste oferă o sensibilitate superioară testelor biologice;

— reacții ce utilizează anticorpi mareați: teste imunoenzimatică și teste radioimunologice care prezintă un grad mare de sensibilitate dar dezavantaje majore prin faptul că nu pot fi aplicate decât în laboratoare cu dotare specială iar timpul de obținere a rezultatelor este de ordinul zilelor.

1. ABARIEL, J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
2. AGRESTI, A. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
3. AGRESTI, A. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
4. ALISON, A. C. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
5. AVRAMES, S. B. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
6. AVRAMES, S. B. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
7. AVRAMES, S. B. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
8. AVRAMES, S. B. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
9. AVRAMES, S. B. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
10. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
11. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
12. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
13. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
14. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
15. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
16. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
17. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
18. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
19. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.
20. BLOCH, R. J. — *Immunochemical methods in clinical medicine* — 1967, 1968, 1969.

## BIBLIOGRAFIE

1. ABABEI L. — Biochimie medicală — Lucrări practice — Catedra de biochimie, Iași, 1973.
2. AGASSE-LAFFONT E., ORINBERG J. — Le laboratoire, vol. I—3, Ed. Vigot — Frères, Paris, 1952—1956.
3. AGASSE-LAFFONT E., ORINBERG J. — Documentaire des constantes biologiques et de leur applications médicales et chirurgicales, L'expansion Scientifique Française, Paris, 1959.
4. ALLISON A. C., HUMHREY J. H. — Estimation of the size of antigens by gel diffusion methods; *Nature*, 1959, 183, 1 590.
5. AVRAMEAS S., B. GUILBERT — Biologically active water insoluble protein-polymers. Their use for the isolation of specifically interacting proteins, *Immunochemistry*, 1971, 53, 603.
6. AVRAMEAS S. — Coupling of E. to proteins with glutaraldehyde, *Immunochemistry*, 1969, 43, 6.
7. BAILEY J. L. — Techniques in Protein Chemistry. Ed. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1967.
8. BERGMEYER H. U., BERNT E., HESS B. — Methods of Enzymatic analysis, Ed. H. U. Bergmeyer, Verlag Chemie, G.M.B.H. Weinheim, 1965.
9. BLAUTH I. O., WAKSMUNDZKI, KAUSKI M. — Chromatography. Symposium, P.W.N., Warszawa, 1957.
10. BLOCK R., DURRUM EL, ZWEI G. — A manual of paper chromatography and electrophoresis. Acad. Press, New York, 1955.
11. BLOCK R. J., EL. DURRUM — 1955 — A Manual of Paper Chromatography and Electrophoresis. Acad. Press, New York, 1968.
12. BOULANGER P., POLONOVSKI J., TAYEU F., MANDEL P., BISETRE G., Biochimie médicale, Ed. 8-a, Masson et Cie, Fasc. III, 1968.
13. BUSSARD A. — Description of a technique simultanously combining electrophoresis and immunological precipitation in gel: electrosyneresis; *Biochim. Biophys. Acta*, 1959, 34, 258.
14. CĂPĂLNA S. — Biochimie dinamică, Editura medicală, 1971.
15. CLARKE I. T. — Simplified Disc (Polyacrylamide Gel) Electrophoresis. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1964, 121, 428.
16. COSMULESCU I., ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M., MICU D., GEORGESCU L. — Manualul laborantului clinic, Ed. medicală, București 1958.
17. COMOROȘAN A., MITRICĂ N. — Biochimie medicală. Manual de laborator clinic, Ed. Medicală, București, 1962.
18. COMOROȘAN S., MITRICĂ N. — Metodele laboratorului clinic — Capitolul Biochimie — Editura medicală, 1965.
19. CROOK E. M. — Ciba Symposium on Paper Electrophoresis, J. A. Churchill, London, 1956.
20. CROWLE A. J. — Immunodiffusion, New-York and London, Academic Press Inc.; 1961.



21. CUATRECASAS P., ANFISEN A. — Affinity chromatography, *Ann. Rev. Biochem.*, 1971, 40, 259.
22. CUATRECASAS P., ANFINSE CH. — Affinity Chromatography. *Meth. in Enzymology*, 1971, 31, 345.
23. DAVID-WEST T. S. — The Standardisation of some Immunodiffusion Systems in Agar Gel; *J. Path. Bact.*, 1966, 92, 477.
24. DREYFUS J. — Séméiologie électrophorétique des protéines du plasma sanguin et de l'hémoglobine, Lyon, 1955.
25. FEINBERG J. G., HILL C. W. — Newer Techniques for Immunoelectrophoresis and Immunodiffusion; *Int. Arch. Alergy. Appl. Immunol.* 1968, 33, 120.
26. FENSTEIN G. — Affinity cromatografy of biologically macromolecules, *Naturwissenschaften*, 1971, 58, 384.
27. FISCHER A., PUTNOKY G. — „Indicațiile și interpretarea examenelor de laborator clinic”, Editura medicală, 1964.
28. FIREMAN et al. — Immunochemical Studies of Human Serum Fractionated by Gel Filtration With Sephadex G-200, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964, 115, 845.
29. FISKE C. H., SUBBAROW Y. — The colorimetric Determination of Phosphorus, *J. Biol. Chem.* 1925, 66, 375.
30. FLODIN P. et al. — Fractionation of Human Serum Proteins by Gel Filtration, *Bioch. Biophys. Acta*, 1962, 63, 403.
31. FLORENCE G., ENSELME J. — Précis de Chimie Biologique et Médicale, Ed. Librairie Maloine, Paris, 1950.
32. GHETIE V., MICUȘAN V. — Analiza imunochimică; Ed. Acad. R.S.R., București, 1966.
33. GITTER A., HEILMEYER L. — „Manual de probe funcționale clinice”, Editura Medicală, 1961.
34. GLICK D. — Methods of biochemical analysis, 4 vol., Acad. Press, New York, 1954—1965.
35. GORDON A. H., FISCHER, I., CLAUSEN J. — Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Ed. North Holland Publishing Company, 374, 1969.
36. GRABAR P., WILLIAMS C. A. — Méthode permettant l'étude conjuguée de propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin; *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, 10, 193.
37. HAIȘ și MACECK — Cromatografia, Ed. tehnică, București.
38. HARRISON A. G. — Chemical methods in clinical medicine. Their applications and interpretation with techniques of simple tests, ed. a III-a, Ed. J. et A. Churchill, Londra, 1947.
39. HAROLD F. — Methods in Immun. and Immunochemistry, 1967, vol. I, p. 315 — 335.
40. HOPPE-SEYLER — Handbuch der physiologisch und pathologisch Chemischeanalyse, Ed. tehnică, 1958.
41. KAK B. C., DIEKENMANN E., WHITE H., BURNETT P., CLERNEY — Rapid estimation of free and total cholesterol. *Amer. J. Clin. Path.* 1954, 24, 1 307.
42. KUCHMEISTER H. — Klinische Funktionsdiagnostik, Ed. III., Georg Thieme Verlag-Stuttgart, 1967, Traducere Ed. Medicală, București, 1973.
43. LITEANU C. — „Chimie analitică cantitativă”, Editura de stat didactică și pedagogică, București 1962.
44. LOISELEUR J. — Techniques de laboratoire, Ed. Masson, Paris, 1954.
45. MANCINI G., CARBONARA C. O., HEREMANS J. F. — Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 1965, 2, 235.
46. MANTA I., CIPLEA A. — Metodele laboratorului clinic, Ed. II, Tipografia Cartea Românească, Cluj, 1947.

47. MANTA I., CUCUIANU M., BENGĂ G., HODĂRNĂU A. — Metode biochimice în laboratorul clinic, Editura DACIA, 1976.
48. Ministerul Sănătății, Academia de științe medicale — „Metode de laborator de uz curent“, Editura Medicală, 1975.
49. NATELSON S., KASER M. — Standard Methods of Clinical Chemistry, vol. I, Ed. Academic Press, New York, 1953.
50. OAKLEY C. L., FULTHORPE A. J. — Antigenic analysis by diffusion; *J. Path. Bact.*, 1955, 65, 49.
51. ORNSTEIN L. — Disc Electrophoresis I. Background and Theory, *Ann. N. Y. Acad. Science*, 1964, 121, 321.
52. ORNSTEIN L., DAVIS B. J. — Disc Electrophoresis. Distillation Products industries, Rochester, N. Y. and Canalco, Bethesda, 1962.
53. OUCHTERLONY O. — Diffusion in gel methods for immunological analysis. In „Progres in Allergy“, 373. Ed. Kallos P., Karger, Basel and New-York, 1948, VI, 178.
54. OUCHTERLONY O. — Antigen — antibody reactions in gels; *Acta Path. Microb. Scand.* 1949, 26, 507.
55. OUDIN J., — Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié; *C. R. Acad. Sci.* 1946, 222, 115.
56. PĂUNESCU-PODEANU A. — Ghid de date biologice normale și patologice, Ed. medicală, București, 1962.
57. PEREZ J. J. — Solubilité et Point Isoioniques de Proteines, in „Techniques de Laboratoire“, 1954, 529.
58. PREDTECENSCHI V. K., BOROVSCAIA V. M., MARGOLINA L. T. — Metode de laborator clinic, Ed. de Stat, București 1962.
59. RACKER E. — Methods in Enzymology, Ed. S. P. Colowick, *Acad. Press, N. Y.* 1965, I.
60. RAMON G. — Flocculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine diphtérique; *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1922, 86, 661.
61. RAYMOND S. — Acrylamide Gel Electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Science*, 1964, 121, 350.
62. SANDERS M. M. et al. — Immunological Cross-Reaction Between Trypsin and Chymotrypsin as a Guide to Structural Homology, *Biochemistry*, 1970, 3/11, 2356.
63. SCHEIDEGGER J. J. — Une microméthode de l'immunoélectrophorèse; *Int. Arch. Allergy*, 1965, 7, 103.
64. SEPHADEX — Gel Filtration in Theory and Practice, Ed. By Pharmacia Fine Chem. 1966.
65. SEPHADEX — Instructions for the Gel Filtration Kit — Ed. By Pharmacia Fine Chem. 1974.
66. SIBI M. — Colecție de metode de laborator, 1947—1963.
67. SONNET J. — Les glycoprotéines sériques à l'état normal et pathologique, Ed. Actia, Bruxelles, 1956.
68. SORU E. — Biochimie medicală, vol. I și II, Ed. Medicală, București, 1963.
69. STAUB A. M., RAYMOND M. — Cours d'immunologie générale et de sérologie de l'Institut Pasteur; CDU, 1971, Ed. 5-a.
70. TĂNĂSESCU GH., IVANOVICI G. — Ghid pentru tehnici curente în laboratorul clinic, Editura medicală, 1965.
71. TARLOTIN J. C. — Microdétermination du glucose dans les liquides biologiques par la méthode à l'orto-toluidine, *Ann. Biol. Clin.* 1966, 1—2, 173.
72. TODD J. C., SANFORD A. H. și WELLS B. B. — Clinical diagnosis by laboratory methods. A working manual of clinical pathology. Ed. W. B. Saunders, Philadelphia și Londra, 1955, Ed. II.



73. URIEL I. — Méthode d'électrophorèse dans des Gels d'acrylamide — Agarose. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1966, 48, 969.
74. VIDAL G. — L'immuno-précipitation en milieu gélosé, *Rev. Med. Vét.*, 1968, 119, 45.
75. VIERU S., SANDRU G., COMOROȘAN S., — Investigații moderne în biochimie, I.M.F. București. 1970.
76. WILLIAMSON J., ALLISON A.C. — Thin Layer Sephadex Chromatography and Immunodiffusion; *Lancet*, 1969, 15 July 123.
77. WUNDERLY C. — Electrophorèse sur papier, Ed. Vigot, Paris, 1956.
78. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M. — Izoenzime în patologie, Editura medicală, București, 1970.
79. ZILIȘTEANU C., NATALIA MITRICĂ, SOFIA LESCINSCHI, CORNELIA GEORGESCU — Serurile antiproteină umană, *Microb. Parazit. Epidem.*, 1968, XIII, 3, 271.





Redactor de carte : Dr. ALGEORGE GEORGE  
Tehnoredactor : ELENA AFILPOAIE

---

Bun de tipar : 1.VI.1981.  
Formatul : 16/70X100/56=80% GA.  
Hîrtie : Scris I A 70X100/56=80% GA.  
Coli tipar : 23.

---



Comanda nr. 90 566  
Combinatul Poligrafic „Casa Scintei”  
București — Piața Scintei nr. 1  
Republica Socialistă România

BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Redacteur de serie : DR. ALDOREGE GEORGE  
Traducteur : ELENA ALBU

Don de la part : D. ALBU  
Formule : 100X100-200, 200, 200  
Haut : 200 X 100-200, 200, 200  
Coul. noir : 200

Composé par : 200  
Composé par : 200  
Composé par : 200  
Composé par : 200







BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

0002346 DEP. LEGAL 1981





BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY